

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Medicina Dentária



**Comportamento osteoblástico em novas superfícies  
implantares de zircónia – estudo *in vitro***

**Beatriz Ferreira Fernandes**

Orientadores:

Professor Doutor António Duarte Sola Pereira da Mata

Professora Doutora Joana Rita Oliveira Faria Marques

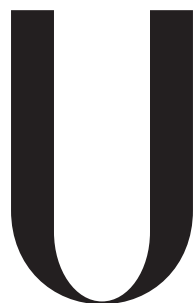
Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária  
2019



Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

---

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA

**Comportamento osteoblástico em novas superfícies  
implantares de zircónia – estudo *in vitro***

**Beatriz Ferreira Fernandes**

Orientadores:

Professor Doutor António Duarte Sola Pereira da Mata

Professora Doutora Joana Rita Oliveira Faria Marques

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2019



*“Mas o melhor meio para alcançar a felicidade é contribuir para a felicidade dos outros. Procurai deixar o mundo um pouco melhor de que o encontrastes e quando vos chegar a vez de morrer, podeis morrer felizes sentindo que ao menos não desperdiçastes o tempo e fizestes todo o possível por praticar o bem.”*

Robert Baden-Powell



## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor António Mata, meu orientador e Investigador Principal do Grupo de Investigação em Biologia e Bioquímica Oral, por ser um exemplo a seguir pela sua sabedoria e espírito crítico. Agradeço de forma mais sincera a oportunidade de fazer parte deste grupo.

À Professora Doutora Joana Marques, minha orientadora, por todas as horas que despendeu ao longo deste projeto. Por todo o carinho e motivação e por todos os conhecimentos que me transmitiu. Porque todas as palavras são poucas para expressar a minha gratidão, sem o seu apoio não seria possível a concretização desta dissertação.

Ao Professor Duarte Marques demonstro o meu mais sincero apreço por me ter acolhido no grupo de investigação. Pela sua exigência que me fez crescer e querer ser mais e melhor.

À Dra. Mariana Cruz pela paciência e pelos conhecimentos partilhados. Por não me deixar falhar e desleixar. Pelo incentivo, pelas gargalhadas e pela amizade.

Ao GIBBO, por se ter tornado uma família na FMDUL. Que sempre me fez sentir integrada e útil. Um agradecimento especial à Carlota, à Susana, à Andreia, à Rita e ao meu amigo Ricardo.

Aos “Mafiosos” por todos os momentos e por toda a amizade ao longo deste curso que, certamente, será para sempre.

À minha família, porque sem eles nada do que alcancei seria possível. Por sempre me apoiarem e motivarem em todos os momentos. Por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos!

A ti, Rodrigo.





## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar o comportamento osteoblástico em superfícies de zircónia texturizadas por laser Nd:YAG.

**Materiais e Métodos:** Discos de zircónia foram tratados superficialmente com laser Nd:YAG em função dos grupos de estudo: diferentes texturas (sulcos e pirâmides), espaçamento (25µm, 30µm e 35µm) e número de passagens de laser (1, 2, 4 e 8). Foram utilizados como controlo discos tratados com jateamento e ataque ácido. Osteoblastos humanos (hFOB 1.19) foram cultivados nestas superfícies e a sua viabilidade celular foi avaliada aos 1, 3, 7 e 14 dias usando um método comercial à base de resazurina. A morfologia e adesão celulares foram observadas através de microscopia eletrónica de varrimento (FEG-SEM). A produção de colagénio tipo I foi avaliada aos 3 dias através de ensaio enzimático de imuno-absorção - ELISA. A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi medida aos 7 e aos 14 dias através de técnica enzimática colorimétrica. Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Foram realizadas comparações entre grupos através do teste ANOVA ou testes de Mann-Whitney (teste post-hoc de Tukey) usando um software de estatística e a significância foi definida como  $p < 0,05$ .

**Resultados:** A proliferação e viabilidade celular aumentaram em todos os grupos ao longo do tempo com valores significativamente superiores nos grupos de teste quando comparados com o grupo de controlo aos 7 e 14 dias de cultura ( $p < 0,05$ ). Os níveis de colagénio tipo I revelaram-se estatisticamente superiores nos grupos tratados com laser ( $p < 0,05$ ). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na atividade da ALP entre os grupos de teste e controlo em nenhum dos tempos ( $p > 0,05$ ).

**Conclusão:** Os resultados sugerem que as superfícies implantares de zircónia texturizadas por laser beneficiam a resposta biológica dos osteoblastos. No entanto, as diferenças entre texturas, espaçamento à escala testada e número de passagens de laser não parecem influenciar a resposta celular.

**Palavras-chave:** “osteoblastos humanos”, “zircónia”, “laser”, “implantes dentários”

## ABSTRACT

**Objectives:** The aim of this study was to evaluate the behavior of human fetal osteoblasts in contact with Nd:YAG laser-machined zirconia implant surfaces.

**Materials and Methods:** Zirconia discs were produced and all surfaces were treated with Nd:YAG laser according to test groups variables: texture (microgrooves and micro pillar-array), distance (25µm, 30µm and 35µm) and laser passes (1, 2, 4 and 8). Untextured, sandblasted and acid-etched zirconia discs were used as controls. Human osteoblasts (hFOB 1.19) were cultured for 14 days on test and control samples. Morphology and cellular adhesion were observed using scanning electron microscopy (SEM). Cell viability and proliferation were evaluated at 1, 3, 7 and 14 days using a commercial resazurin-based method. Collagen type I was evaluated at 3 days using ELISA. Alkaline phosphatase (ALP) activity was evaluated at 7 days using a colorimetric enzymatic technique. Group comparisons were tested using ANOVA or Mann-Whitney test (Tukey's post-hoc) using statistical software and significance was set at  $p < 0.05$ .

**Results:** Cell viability and proliferation increased over time for all groups with statistically higher values for laser-textured groups when compared to control at 7 and 14 days in culture ( $p < 0.05$ ). Collagen type I levels were higher for study groups ( $p < 0.05$ ) when compared with control group. No statistically differences were detected for ALP activity levels between texture and control groups ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** The results suggest that laser-machined zirconia implant surfaces may benefit biological osteoblast response. However, the type of texture, spacing at the range 25-35µm and number of laser passes did not seem to be relevant variables.

**Keywords:** "human osteoblasts", "zirconia", "laser", "dental implants"

## ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. Laser	5
2. Modelos de osteointegração in vitro	6
OBJETIVOS	7
MATERIAIS E MÉTODOS	9
Discos	9
Culturas celulares	10
Viabilidade celular e ensaio de proliferação	11
Morfologia celular	11
Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)	12
Elisa Pró-colagénio humano I $\alpha$ 1	12
Análise estatística	12
Cálculo da dimensão amostral e poder estatístico	13
RESULTADOS	14
Objetivo 1 – Avaliar a influência do espaçamento entre as passagens de laser no comportamento celular	14
Objetivo 2 – Avaliar a influência da textura no comportamento celular	17
Objetivo 3 – Avaliar a influência do número de passagens de laser no comportamento celular	18
Visualização das diferentes superfícies e adesão e comportamento celular às 24h por FEG-SEM	21
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	30
BIBLIOGRAFIA	31
ANEXOS	36

## ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultados de viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos A, E, I, RL e controlo positivo aos 1, 3, 7 e 14 dias de cultura (n=15). O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: * p<0,05.	14
Gráfico 2 – Resultados <b>(A)</b> da produção de colagénio tipo I (n=3) aos 3 dias de cultura e <b>(B)</b> da atividade da fosfatase alcalina (n=2) aos 7 e 14 dias de cultura, como média ± desvio padrão em valores pg/mL e µmol/min/mL, respetivamente dos grupos A, E, I, RL e controlo positivo. O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: * p<0,05.	15
Gráfico 3 – Resultados de viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos M, Q, U, RL e controlo positivo aos 1, 3, 7 e 14 dias de cultura (n=15). O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: *p<0,05.	15
Gráfico 4 – Resultados <b>(A)</b> da produção de colagénio tipo I (n=3) aos 3 dias de cultura e <b>(B)</b> da atividade da fosfatase alcalina (n=2) aos 7 e 14 dias de cultura, como média ± desvio padrão em valores pg/mL e µmol/min/mL, respetivamente dos grupos M, Q, U, RL e controlo positivo. O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: * p<0,05.	16
Gráfico 5 – Resultados de viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos A e M, controlo sem textura e controlo positivo aos 1, 3, 7 e 14 dias de cultura (n=15). O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: *p<0,05.	17

Gráfico 6 – Resultados <b>(A)</b> da produção de colagénio tipo I (n=3) aos 3 dias de cultura e <b>(B)</b> da atividade da fosfatase alcalina (n=2) aos 7 e 14 dias de cultura, como média $\pm$ desvio padrão em valores pg/mL e $\mu\text{mol/min/mL}$ , respetivamente dos grupos A, M, RL e controlo positivo. O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: * $p<0,05$ .	17
Gráfico 7 – Resultados de viabilidade celular como média $\pm$ desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos A, B, C e D, controlo sem textura e controlo positivo aos 1, 3, 7 e 14 dias de cultura (n=15). O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: * $p<0,05$ .	18
Gráfico 8 – Resultados <b>(A)</b> da produção de colagénio tipo I (n=3) aos 3 dias de cultura e <b>(B)</b> da atividade da fosfatase alcalina (n=2) aos 7 e 14 dias de cultura, como média $\pm$ desvio padrão em valores pg/mL e $\mu\text{mol/min/mL}$ , respetivamente dos grupos A, B, C, D, RL e controlo positivo. O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: * $p<0,05$ .	19
Gráfico 9 – Resultados de viabilidade celular como média $\pm$ desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos M, N, O e P, controlo sem textura e controlo positivo aos 1, 3, 7 e 14 dias de cultura (n=15). O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: * $p<0,05$ .	19
Gráfico 10 – Resultados <b>(A)</b> da produção de colagénio tipo I (n=3) aos 3 dias de cultura e <b>(B)</b> da atividade da fosfatase alcalina (n=2) aos 7 e 14 dias de cultura como média $\pm$ desvio padrão em valores pg/mL e $\mu\text{mol/min/mL}$ , respetivamente dos grupos M, N, O, P, RL e controlo positivo. O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: * $p<0,05$ .	20

Figura 1 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (FEG-SEM) inicial e após o primeiro dia de cultura das superfícies dos grupos A, B, C, D, E, I, M, N, O, P, Q, U e RL. Ampliações 120x e 500x. Podem ser observadas imagens adicionais com diferentes ampliações nos anexos.	21
Figura 2 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (FEG-SEM) após o primeiro dia de cultura das superfícies dos grupos A, B, C, D, E, I, M, N, O, P, Q, U e RL. Ampliações 100x e 200x.	36

## **ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1 - Tabela com descrição das características das amostras.	9
---	---

## ABREVIATURAS

μl - Microlitro

μm – Micrómetro

ALP – Fosfatase Alcalina

cm<sup>2</sup> – Centímetro quadrado

CMEMS – Unidade de Investigação em Microssistemas Eletromecânicos da Universidade do Minho

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DP – Desvio Padrão

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

FEG-SEM – *Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy*

FMDUL – Faculdade de Medicina Dentária de Lisboa

hFOB – *Human fetal osteoblast cell line*

kHz – Quilo-hertz

Laser – *Light amplification by stimulated emission of radiation*

MC3T3-E1 – *Primary bone cell cultures from mouse*

MG-63 – *Clonal cell line derived from bone tumors*

mg/ml – Miligramas por mililitro

mJ- Micro-joule

mm/s – Milímetros por segundo

μmol/min/mL – Micromole por minuto por microlitro

MUP - Fosfato de 4-metilumbeliferil

Nm - Nanómetro

°C – Graus Celsius

PBS – Tampão fosfato salino

PEEK – *Polyetheretherketone*

pg/mL – Picograma por mililitro

RL – Discos não texturizados por laser

S(a) – Rugosidade de superfície

SaOs-2 – *Human Osteosarcoma Cell Line*

SLC – *Sisma Laser Controller*

SPH – Partículas de fosfato de cálcio



STP – Partículas de titânio

UA – Unidades Arbitrárias

UMinho – Universidade do Minho

v/v – Percentagem volúmica

W - Watt

Y-TZP – Zircónia tetragonal policristalina estabilizada com ítrio



## INTRODUÇÃO

A reabilitação protética com implantes é uma alternativa que deve reproduzir as principais funções das estruturas dentárias, assim como apresentar boa biocompatibilidade, resistência mecânica, resistência ao desgaste e à corrosão. (1, 2) O fator de sucesso *major* dos implantes dentários é a osteointegração, que se define como sendo a conexão estrutural e funcional entre o osso e a superfície do implante sob carga. (1, 3, 4)

O titânio puro e as suas ligas (destacando-se a Ti-6Al-4V) são, presentemente, o material mais utilizado na confecção de implantes dentários pelas suas excelentes propriedades a nível mecânico e biológico. (5-9) No entanto, este material apresenta como desvantagens a estética, em que a coloração acinzentada pode se tornar visível através dos tecidos gengivais, a ocorrência de reações alérgicas e a corrosão que leva à libertação de iões e detritos. (4, 8-13)

Face a estas desvantagens, têm vindo a ser exploradas alternativas ao titânio, nomeadamente materiais cerâmicos (alumina, zircónia) e polímeros orgânicos (como o PEEK). A alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) é uma cerâmica que já foi utilizada no passado em implantes dentários. Este material apresentava uma boa osteointegração, mas devido às suas insuficientes propriedades mecânicas para este efeito foi retirado do mercado. (14) Nesse sentido, a zircónia (óxido de zircónio) foi proposta como alternativa com melhoria das propriedades mecânicas face à alumina. Este material, utilizado inicialmente apenas na reabilitação sobre dentes e implantes, foi posteriormente expandido ao fabrico de implantes dentários devido aos excelentes resultados biológicos e mecânicos. (4, 11, 14)

A zircónia pode assumir diferentes estruturas cristalinas: monoclinica, tetragonal ou cúbica. À temperatura ambiente a zircónia pura tem uma estrutura cristalina monoclinica. A fim de evitar a fratura da zircónia pura à temperatura ambiente são adicionados óxidos à sua constituição, como por exemplo, óxido de magnésio ( $\text{MgO}$ ), óxido de ítrio ( $\text{Y}_2\text{O}_3$ ), óxido de cálcio ( $\text{CaO}$ ) e óxido de cério ( $\text{Ce}_2\text{O}_3$ ), que permitem a presença da estrutura tetragonal e, consequentemente, impedem a propagação de fissuras e aumentam a sua dureza. (7, 15)

Neste sentido, a zircónia tetragonal policristalina estabilizada com ítrio (Y-TZP) é atualmente o material cerâmico de primeira linha utilizado na manufatura de implantes dentários. Este apresenta elevada resistência à flexão, desgaste e corrosão, assim como estética natural. As suas características biológicas, tais como biocompatibilidade e baixa afinidade para a colonização bacteriana fazem de si um material de eleição. (1, 3, 4, 9, 12-14, 16-21) Apresenta ainda uma boa adaptação ao tecido conjuntivo e ósseo, sendo que em estudos realizados em animais tem sido observado que a osteointegração da zircónia é semelhante à do titânio. (4, 21,

22) Contudo, a zircónia apresenta uma instabilidade estrutural com degradação a baixas temperaturas e ambientes húmidos, muitas vezes definida como o fenómeno de envelhecimento ou “aging”. (1, 9) Este fenómeno consiste na passagem da fase tetragonal da zircónia para a fase monoclinica, resultando numa condição de *stress* e fragilidade do material que pode levar à formação de fendas na cerâmica e posteriormente à sua fratura, o que constitui uma limitação clínica da utilização da zircónia como estrutura implantar. (9) O processo de fabrico pode também estar envolvido na génese deste fenómeno, nomeadamente pelos tratamentos de superfície, autoclavagem e cargas cíclicas. (4) Todavia, existe uma alteração da integridade da fase do material. Este mecanismo de endurecimento (*transformation toughening*) atua para inibir a propagação de fissuras através do aumento de volume, promovendo a estabilidade da fase tetragonal e aumentando a rigidez da zircónia. (2, 4, 7)

Além do material de base, as modificações no desenho do corpo do implante e na sua superfície influenciam significativamente o sucesso da osteointegração pela promoção de uma maior área de superfície, contribuindo assim para o aumento da resistência na interface osso-implante, o crescimento ósseo mais acelerado, a melhor estabilidade inicial do implante e uma melhor distribuição do *stress*. (23) As propriedades superficiais apontadas como fatores-chave para o processo fisiológico de osteointegração implantar são: a topografia, a composição química, a carga superficial e a molhabilidade. (24, 25) A natureza hidrofílica de uma superfície implantar promove a adesão proteica e celular, resultando no aumento da cinética de cicatrização tecidular. (3) Está também descrita uma associação entre a topografia, a força de adesão e o comportamento celular, sendo que esta varia em função das linhagens celulares. (3, 11, 18, 25-29) Existe assim uma boa evidência científica e consenso clínico de que os implantes rugosos (rugosidade de superfície  $S(a) > 1,5\mu\text{m}$ ) apresentam melhor ancoragem ao osso do que implantes com superfícies relativamente lisas ( $S(a) < 1\mu\text{m}$ ) (3, 10, 11, 14, 27), uma vez que poderão facilitar o processo de osteointegração através do maior contacto do osso com a superfície do implante, o que resulta também no aumento da retenção mecânica. (30) A superfície maquinada apresenta microrranhuras superficiais que resultam do processo de corte e, conseqüentemente, numa superfície não totalmente lisa. Os implantes maquinados têm um valor médio de  $S(a)$  entre 0,53 e 0,96 $\mu\text{m}$ , num espectro desfavorável à osteointegração. (5, 23)

O tratamento de superfícies de titânio visando promover a osteointegração está extensivamente caracterizado na literatura (13), podendo as estratégias ser agrupadas em 2 grandes grupos: os métodos de adição e os métodos de subtração.

O método de adição mais comum é o *spray* de plasma, realizado com partículas de titânio (STP) ou fosfato de cálcio (SPH), com espessuras que variam de 10 a 40µm para STP e de 50 a 70µm para SPH. Uma superfície nanotexturizada pode ser obtida através de um aumento controlado da camada de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). A média de diâmetro dos poros fica em torno de 1 a 2µm. A camada de óxido é fortemente aderida ao metal subjacente, o que sugere risco mínimo de libertação de partículas. Atualmente também é possível obter superfícies biomiméticas através da deposição de camada de fosfato de cálcio ou hidroxiapatite. (20, 23)

O jateamento de partículas de vários diâmetros é um método frequentemente utilizado como técnica de subtração. A superfície do implante é jateada com partículas de diversos materiais (silício, óxido de alumínio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e vidro), criando, por meio de abrasão, uma superfície com ranhuras irregulares que são influenciadas por diversos fatores como o tamanho e forma das partículas, a distância da ponta do jato à superfície do implante e o tempo de jateamento. A rugosidade média pode variar entre 1,2 e 2,2µm. Outra técnica subtrativa é o ataque ácido com ácido sulfúrico ou hidrocloreídrico, resultando numa rugosidade média de 1,30µm. O tratamento por ácido pode também ser realizado após a técnica de jateamento. (23)

O processamento a laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) é um novo método que produz um alto grau de pureza. Embora a superfície do metal seja produzida pela sinterização a laser, pode não ser a ideal para promover a osteointegração e, portanto, convém ser posteriormente tratada com outros métodos para melhorar as respostas biológicas. (23)

Na zircónia têm sido aplicadas e testadas texturas de superfície baseadas nas utilizadas no titânio. Contudo, os parâmetros de rugosidade reportados para os implantes de zircónia são inferiores aos dos implantes de titânio quando submetidos ao mesmo tipo de tratamento. Consequentemente, é de esperar que a força de integração osso-implante e a percentagem de formação óssea em torno dos implantes seja inferior nos implantes de zircónia em comparação com os de titânio. (10) A qualidade da osteointegração é habitualmente avaliada *in vivo* através do contacto osso-implante (baseado na análise histológica) e dos valores de torque reverso. (4, 27) No entanto, estes valores não refletem a qualidade do osso, a presença de inflamação nem reações de corpo estranho. (4) Revisões sistemáticas (1, 7, 31, 32) que incluíam estudos animais compararam a osteointegração de implantes de titânio e zircónia. De uma forma geral, a maioria dos estudos reportou a inexistência de diferenças estatisticamente significativas no contacto osso-implante e no torque reverso quando perante tratamentos de superfície equivalentes.

Contudo, a taxa de falha precoce dos sistemas de implantes de zircónia testados no modelo animal até ao momento, é significativamente superior em comparação com os implantes de titânio (44% e 12%, respetivamente). (4) É importante salientar que os estudos incluídos diferiram no modelo animal utilizado, no tempo de carga, na localização do implante e, portanto, a generalização destes resultados apresenta limitações. (4) Um estudo clínico realizado por Osman *et al.* (32), não encontrou diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito à taxa de sucesso a 1 ano de *follow-up* após protocolo de carga convencional entre implantes de zircónia e de titânio colocados na mandíbula e na maxila (90,9% e 55% para a zircónia e 95,8% e 71,9% para o titânio, respetivamente).

Sabe-se ainda que a zircónia é um material biologicamente inerte, o que significa que embora não seja capaz de iniciar uma reação adversa nos tecidos do hospedeiro após a sua implantação, também não induz uma reação favorável. (20) Como tal, várias estratégias devem ser usadas para melhorar a bioatividade do implante e a taxa de sucesso a longo prazo, incluindo superfícies tratadas com substâncias formadoras de poros, superfícies maquinadas ou jateadas com partículas de 250µm de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, jateamento combinado com tratamento ácido, modificações nanométricas, superfícies cobertas com camada de óxido de titânio libertadora de cálcio ou cerâmica bioativa e jateamento com a adição de nano-retentores. (12) A fotolitografia é também uma ferramenta eficaz para a criação de topografias para o estudo do comportamento celular. No entanto, a sua aplicação na investigação do comportamento celular é limitada uma vez que é difícil alcançar características à nanoescala. (16) Todavia, devido às propriedades mecânicas da zircónia, nomeadamente, a baixa flexibilidade e processabilidade, a metodologia ótima de modificação de superfície ainda não está esclarecida. (18) A título de exemplo, o jateamento pode aumentar ou diminuir a força de flexibilidade inicial da Y-TZP dependendo do tipo e tamanho das partículas e da pressão do jato. (14) Assim, por maneira a diminuir o potencial dano físico induzido pelo tratamento de superfície na zircónia, têm sido testadas diversas técnicas entre as quais a tecnologia laser. (4) Esta técnica permite também a padronização controlada da superfície, o que poderá constituir um interesse adicional. (33) É necessária, então, uma caracterização detalhada da superfície dos implantes de zircónia texturizados por laser por forma a permitir o seu desenvolvimento focado na potencial aplicação clínica, com otimização da resposta biológica e sem perda de propriedades mecânicas. (18)

## 1.LASER

Como já referido anteriormente, a texturização com laser permite uma caracterização direcionada e programada da superfície. Existem vários tipos de laser: no estado sólido (Nd:YAG, Ti:safira e laser de fibra), lasers de gás (CO<sub>2</sub>) e lasers de líquidos (corante orgânico líquido). O que por norma é utilizado nas superfícies de zircónia é o Nd:YAG. (18, 21, 25, 34) O feixe de laser é disparado na superfície, aquecendo o material a altas temperaturas e levando à sua remoção, permitindo a formação de micro e nano topografias precisas e reproduzíveis. (35) Neste processo existe alteração da topografia e molhabilidade sem alteração química da superfície. (36) Todavia, as temperaturas elevadas levam ao desenvolvimento de tensões térmicas o que faz com que a superfície tratada tenha uma resistência à fratura reduzida e elevada tensão residual, o que limita a sua posterior aplicação prática. (37) De modo a colmatar esta limitação, podem ser utilizadas múltiplas passagens de laser para atingir determinada profundidade de textura em detrimento de uma única passagem que requer maior energia. (38)

É o único método que permite a realização rápida e precisa de textura sem contacto direto com o implante. Desta forma, não afeta a fase tetragonal da zircónia, mantém a superfície limpa e homogênea e reduz o risco de contaminação da superfície. (12, 29)

Esta técnica tem sido descrita como promissora para as aplicações biomédicas pois permite uma melhoria da osteointegração. Em estudos realizados em humanos, os implantes dentários de titânio com sulcos obtidos por laser apresentam redução da perda óssea da crista e inibição da migração apical do epitélio com forte ligação do tecido gengival. (26) Outra vantagem desta técnica é o facto de diversas texturas poderem ser produzidas na superfície.

Num estudo *in vitro* de Delgado-Ruiz *et al.* (21) observou-se que sulcos com 30µm de largura e 70µm de espaçamento em discos de zircónia corresponderam a dimensões ótimas para guiar o crescimento osteoblástico, o que se encontra de acordo com outro estudo em implantes de titânio. (39) Noutro estudo *in vitro* com zircónia, verificou-se um maior crescimento osteoblástico em poros com 30µm de diâmetro independentemente da profundidade dos mesmos. (40) Os resultados indicaram também que regiões com padrões de menor diâmetro e profundidade (10µm e 3 ou 10µm, respetivamente) sugerem uma morfologia celular mais alongada. Estes resultados poderão ser explicados pelo facto do tamanho médio dos osteoblastos variar entre 20-30µm. (39) No entanto, o suporte científico no que respeita a colonização celular e osteointegração em superfícies de zircónia tratadas com recurso a uma micro texturização por laser é escasso e incompleto, existindo várias questões a responder,

nomeadamente o espaçamento ótimo e profundidade dos padrões e o tipo de padrões gerador de respostas celulares mais favoráveis. (21, 40)

## **2.MODELOS DE OSTEOINTEGRAÇÃO *IN VITRO***

Diversos modelos de culturas celulares têm sido empregues no estudo da biologia celular dos osteoblastos, incluindo células primárias humanas ou de diferentes espécies, osteoblastos induzidos a partir de células estaminais pluripotentes, células imortalizadas e linhas celulares malignas. A grande vantagem das células primárias humanas é a sua maior proximidade à realidade *in vivo*, tornando-as numa escolha preferencial para estudos *in vitro*, mas, por outro lado, apresentam fenótipo heterogéneo, o número de passagens é limitado e são de difícil acesso. (41, 42)

No caso das linhas celulares originadas a partir de células neoplásicas, o número ilimitado de passagens celulares é uma mais-valia, embora a progressão não seja fisiológica e não representem toda a gama de características fenotípicas dos osteoblastos. Desta forma, as linhas celulares obtidas a partir de células primárias saudáveis, posteriormente imortalizadas através de vetores virais representam uma resposta a estas limitações. Com este tipo de abordagem, consegue-se facilidade de manutenção, número ilimitado de células sem a necessidade de isolamento e relativa estabilidade fenotípica e comportamento similar à das células primárias, na medida em foi descrita a progressão de heterogeneidade fenotípica entre linhagens celulares com o aumento do número de passagens celulares. (41)

As linhas celulares de osteoblastos mais comumente utilizadas são MC3T3-E1, hFOB, MG-63 e SaOs-2. Estas linhas de osteoblastos fornecem uma população homogénea de células. Contudo, não podemos esquecer que, sendo linhas celulares de origem neoplásica, não refletem na totalidade o comportamento de células primárias. (41) A linhagem hFOB 1.19, mantida pela ATCC (CRL-11372<sup>TM</sup>; American Culture Collection, Manassas, Virgínia, EUA) deriva de uma biópsia obtida a partir de aborto espontâneo (42), apresentando anomalias cromossómicas residuais. (27) Esta linha celular constitui um modelo para o estudo do comportamento celular ósseo em superfícies implantares largamente validado (20, 21, 27), apresentando um fenótipo funcional mantido face às células primárias, com expressão mantida de osteopontina, osteonectina e colagénio tipo I, bem como a capacidade de formação de nódulos mineralizados. (42)



## OBJETIVOS

No âmbito de uma colaboração entre FMDUL e UMinho, foi desenvolvida e caracterizada na Universidade do Minho – CMEMS, uma nova estratégia para produção e caracterização de materiais à base de Zircónia utilizando laser Nd:YAG, tendo sido desenvolvidas estratégias envolvendo a criação de microtexturas de linhas/sulcos com espaçamentos entre 25 e 35µm – selecionados com base na dimensão média dos odontoblastos já anteriormente referida, e a adaptação do desenho de modo a obter uma textura de linhas cruzada, fazendo uma segunda passagem do laser a 90° (pirâmides). Embora a caracterização mecânica destes materiais esteja já em curso, não é conhecida a influência destes fatores na resposta biológica.

O objetivo desta dissertação consiste essencialmente na avaliação do comportamento celular osteoblástico nestas novas superfícies de zircónia texturizadas por laser, considerando como variáveis: espaçamento entre passagens de laser, tipo de textura (passagens de laser numa única direção ou em direções cruzadas), número de passagens de laser.

De forma a cumprir o objetivo principal definiu-se como objetivos específicos:

1. Avaliar a influência do espaçamento entre passagens de laser no comportamento celular.

H0: O espaçamento entre passagens de laser não influencia o comportamento celular *in vitro* de osteoblastos humanos.

H1: O espaçamento entre passagens de laser influencia o comportamento celular *in vitro* de osteoblastos humanos.

2. Avaliar a influência da textura no comportamento celular.

H0: Em superfícies de zircónia com diferentes texturas realizadas por laser não existem diferenças no comportamento celular *in vitro* de osteoblastos humanos.

H1: Em superfícies de zircónia com diferentes texturas realizadas por laser existem diferenças no comportamento celular *in vitro* de osteoblastos humanos.

3. Avaliar a influência do número de passagens de laser no comportamento celular.

H0: O número de passagens de laser não influencia o comportamento celular *in vitro* de osteoblastos humanos.

H1: O número de passagens de laser influencia o comportamento celular *in vitro* de osteoblastos humanos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Discos

A texturização da zircónia resultou de uma parceria com a Universidade do Minho, tendo as mesmas sido desenvolvidas, produzidas e caracterizadas quanto às suas características físicas e mecânicas na Unidade de Investigação em Microssistemas Eletromecânicos da Universidade do Minho (CMEMS). Os passos de caracterização biológica descritos neste trabalho foram realizados no Laboratório de Cultura Celular da FMDUL.

Os discos de zircónia ( $ZrO_2$ ) foram obtidos a partir do pó de 3Y-TZP prensado (Tosoh Corporation®, Amesterdão, Holanda). Um total de 15 discos com um diâmetro de 10mm e 1mm de altura foram produzidos para cada grupo. Todos os grupos deste estudo apresentaram superfícies obtidas através de maquinagem a laser, laser Nd:YAG (Sisma ©, Vicenza, Itália) com as seguintes características: 1W de potência, 128mm/s de velocidade, 1,064 $\mu$ m de comprimento de onda, tecnologia de laser díodo, 20 kHz de taxa de repetição, energia máxima de pulso de 0,3mJ e 3 $\mu$ m de diâmetro do feixe. Este laser está conectado ao *software* Inskape através de um computador, que permite editar a forma e a dimensão da textura. Através do *software* Sisma Laser Controller (SLC) ligado ao laser é possível controlar e seleccionar os parâmetros pretendidos para a produção das texturas. (43) Esta escolha baseou-se em estudos já realizados com este tipo de laser na produção de texturas na superfície de zircónia. Após a texturização das superfícies, as amostras foram sinterizadas. Posteriormente as amostras de referência (RL), foram jateadas com partículas de alumina ( $Al_2O_3$ ) com tamanho médio de 250  $\mu$ m a uma pressão de 6 bar durante 30 segundos a uma distância aproximada de 12cm e imersas em ácido fluorídrico (HF 48%) durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Tabela 1 - Tabela com descrição das características das amostras.

	Designação	Espaçamento ( $\mu$ m)	Número de passagens de laser
Pirâmides	A	25	1
	B	25	2
	C	25	4
	D	25	8
	E	30	1

	I	35	1
Sulcos	M	25	1
	N	25	2
	O	25	4
	P	25	8
	Q	30	1
	U	35	1
Controlo	RL		

## Culturas celulares

Os osteoblastos fetais humanos - hFOB 1.19 foram obtidos a partir do repositório da ATCC® (CRL-11372™; American Culture Collection, Manassas, Virgínia, EUA). Após descongelamento das células, iniciou-se a cultura celular num frasco de 75 cm<sup>2</sup> (VWR™, Radnor, Pensilvânia, EUA) com meio de cultura composto por uma mistura (1:1 v/v) de Ham's F12 Medium (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA) e Dulbecco's Modified Eagle's Medium-DMEM (Biowhittaker™, Lonza™, Basileia, Suíça) suplementado com 0.3 mg/mL de G418 (InvivoGen, Toulouse, França) e soro bovino fetal 10% (Biowest, Nuaille, França).

As células foram incubadas numa incubadora adaptada (Mettler®, Schwabach, Alemanha) em condições ambientais controladas: 5% CO<sub>2</sub>, humidade 98% e uma temperatura de 37 °C. Tratando-se de culturas celulares toda a manipulação foi realizada utilizando a técnica asséptica de manipulação com recurso a câmara de fluxo laminar (Biobase®, Jinan, China). O meio da cultura foi trocado após 1 dia de cultura inicial e durante a fase de multiplicação e crescimento em cada frasco de cultura a cada 3 dias. Quando as células atingiram uma confluência aproximada de 100%, procedeu-se ao destacamento enzimático destas células da superfície de crescimento, utilizando Tripsina-EDTA (Lonza™, Basileia, Suíça). A contagem do número de células viáveis foi efetuada através da contagem numa câmara de Neubauer (Laboroptik Ltd., Lancing, Reino Unido) com recurso à coloração por *Trypan-Blue* (AMRESCO®, Solon, Ohio, EUA).

Os discos das amostras esterilizados foram distribuídos em placas de cultura de 48 poços (Corning Inc®, Corning, Nova Iorque, EUA) e foram incubados durante 1 hora com meio de cultura apropriado. Posteriormente as células foram semeadas nos discos a uma densidade de

1x10<sup>4</sup> células/poço com 500µl de meio de cultura. Todas as experiências foram conduzidas utilizando uma quarta passagem, permitindo assim assegurar homogeneidade de comportamento entre diferentes experiências.

#### *Viabilidade celular e Ensaio de proliferação*

A viabilidade celular e proliferação das culturas celulares em cada superfície foram avaliadas usando um ensaio de viabilidade baseado na redução de rezasurina – reagente Cell-TiterBlue® (Promega®, Madison, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. A taxa de conversão do corante azul não-fluorescente (possível apenas em mitocôndrias de células viáveis) foi determinada como intensidade de fluorescência em unidades de fluorescência arbitrárias (UA) depois de 1, 3, 7 e 14 dias de cultura. A intensidade de fluorescência foi detetada a comprimentos de onda de excitação 530/30nm e emissão de 595/10nm usando um leitor multimodo de microplacas (VICTOR Nivo™ HH3500, PerkinElmer®, Pontyclun, Reino Unido). Foram realizados três ciclos de cultura.

#### *Morfologia celular*

Os osteoblastos foram cultivados em amostras por 1 dia (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Após lavagem com tampão fosfato-salino – PBS (VWR™, Radnor, Pensilvânia, EUA), uma solução de fixação de Glutaraldeído 1,5% (VWR™, Radnor, Pensilvânia, EUA) foi adicionada aos poços de cultura. A desidratação foi realizada através de soluções aquosas de etanol (LaborSpirit Lda, Loures, Portugal) de concentração crescente de 50% a 100%, com intervalos de 10%, e por 30 min para cada solução.

As amostras foram cobertas com um filme ultrafino (15 nm) de ouro-paládio (Au-Pd) (80-20 massa %), usando um aplicador de pulverização catódica de elevada resolução (208HR Cressington Company, Watford, Reino Unido), acoplado a um controlador de espessura de elevada resolução MTM-20 Cressington.

As amostras foram observadas sob Microscopia Eletrônica de Varrimento – *Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy* (FEG-SEM) - FEI NOVA 200 Nano SEM, FEI, EUA. As imagens eletrônicas secundárias, por exemplo topográficas, foram realizadas a diferentes ampliações (100, 120, 200 e 500x), a uma voltagem de aceleração de 10kV. A análise de imagem foi realizada por dois investigadores calibrados, focando-se na morfologia celular, distribuição e estabelecimento de contacto precoce com os materiais.

### *Atividade da Fosfatase alcalina (ALP)*

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi medida aos 7 e 14 dias de cultura de osteoblastos, usando um ensaio enzimático colorimétrico - ab83371 *ALP Assay Colorimetric* (Abcam®, Cambridge, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Através desta técnica, é possível determinar a atividade funcional dos osteoblastos diferenciados pela produção da fosfatase alcalina que irá clivar um grupo fosfato de um substrato adicionado às células (MUP). Uma curva padrão foi realizada a cada medida para calcular a atividade enzimática. Os valores padrão e amostras foram medidos por colorimetria a comprimentos de onda de excitação de 405/10nm usando um leitor multimodo de microplacas (VICTOR Nivo™ HH3500, PerkinElmer®, Pontyclun, Reino Unido). As experiências foram conduzidas em duplicado por cada tempo de medição.

### *ELISA Pró-colagénio humano I $\alpha$ 1*

Os valores de colagénio tipo I presentes no sobrenadante celular foram determinados aos 3 dias de cultura sobre as superfícies utilizando técnica ELISA *sandwich* (R&D Systems Inc, Minneapolis, Minnesota, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A densidade ótica dos valores padrão e das amostras foi medida em dois comprimentos de onda (450nm e 540nm), a fim de obter valores mais exatos. A medição foi realizada utilizando um leitor multimodo de microplacas (VICTOR Nivo™ HH3500, PerkinElmer®, Pontyclun, UK) e aos valores obtidos com o comprimento de onda 450nm foram subtraídos os valores resultantes dos 540nm. Todas as experiências foram conduzidas em triplicado.

### *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada usando o software IBM® SPSS® 25.0 para Mac (SPSS, Chicago, EUA) e GraphPad Prism 6 para Mac (GraphPad Software, Inc. San Diego CA, EUA). Foi realizado o teste Kolmogorov-Smirnov para os vários grupos de forma a confirmar a distribuição normal das amostras. A comparação entre grupos para viabilidade celular, secreção de Colagénio tipo I e atividade de ALP foi realizada com base na análise da variância em 1 sentido de medidas repetidas com recorrência (*one-way* ANOVA) ou testes de Mann-Whitney, segundo o mais apropriado, com recurso a testes *post-hoc* de Tukey para identificar diferenças estatisticamente significativas entre grupos. O nível de significância foi estabelecido a  $p < 0.05$ . Todos os resultados foram apresentados como uma média  $\pm$  desvio padrão (DP).

### *Cálculo da dimensão amostral e poder estatístico*

Foram realizadas estimativas da dimensão da amostra para cada uma das hipóteses testadas baseadas numa taxa de erro tipo I ( $\alpha$ ) de 0.05 e de poder estatístico de 0.80 ( $\beta$ ).

Com base em resultados preliminares da viabilidade celular em dois tipos de superfícies implantares modificadas aos 14 dias de observação (ver resultados preliminares obtidos em discos de Zircónia VS Zircónia com fosfato  $\beta$  tricálcico com culturas celulares de osteoblastos humanos fetais hFOB 1.19) (20) e com auxílio de um simulador para cálculo do tamanho da amostra: G\*Power 3.1.9.0 for Mac, (Dusseldorf, Alemanha) (44), foi determinado um N= 12 para cada grupo como necessário para detetar uma dimensão de efeito de 1,4 com poder estatístico de 0,80. Por motivo de conveniência experimental, a dimensão final da amostra foi ampliada para n=15, permitindo a realização de 3 ciclos consecutivos de 5 amostras por grupo.

## RESULTADOS

### Objetivo 1 – Avaliar a influência do espaçamento entre as passagens de laser no comportamento celular

#### 1.1. Pirâmides

De acordo com o gráfico 1, todos os grupos apresentaram um aumento da viabilidade celular ao longo do tempo, com valores significativamente superiores nos grupos de estudo em comparação com os discos sem textura (RL) aos 7 e 14 dias de cultura ( $p < 0,05$ ).

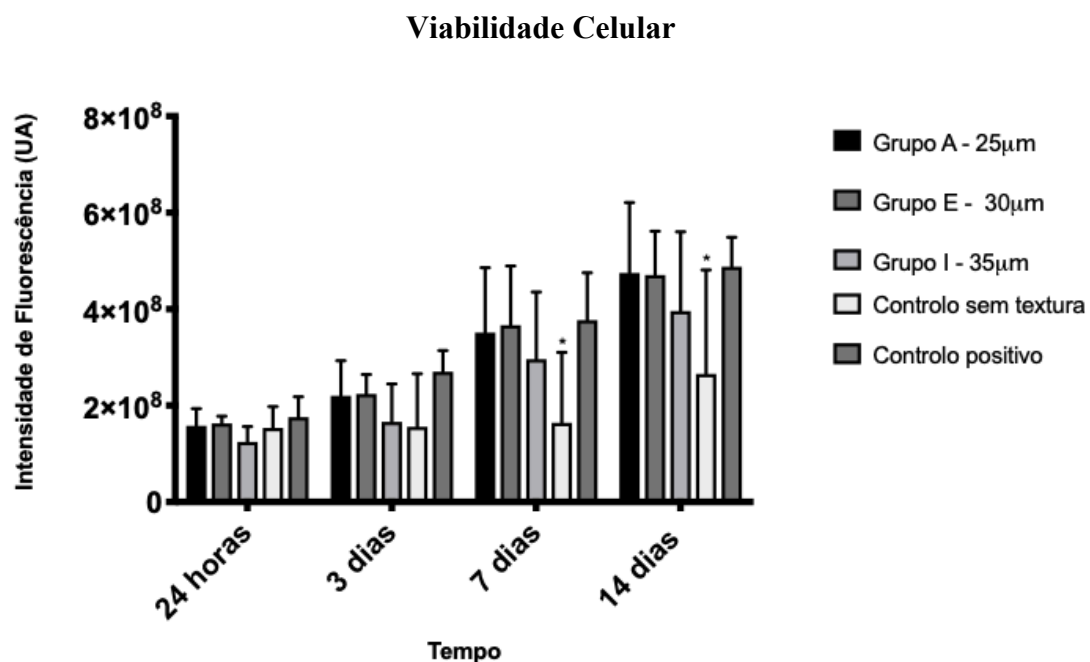


Gráfico 1 – Resultados de viabilidade celular como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos A, E, I, RL e controlo positivo aos 1, 3, 7 e 14 dias de cultura ( $n=15$ ). O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: \*  $p < 0,05$ .

Os níveis de colagénio foram cerca de 10 vezes superiores nos grupos com tratamento laser quando comparados com o controlo sem tratamento ( $p < 0,05$ ). No entanto, não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo (A, E e I) ( $p > 0,05$ ).



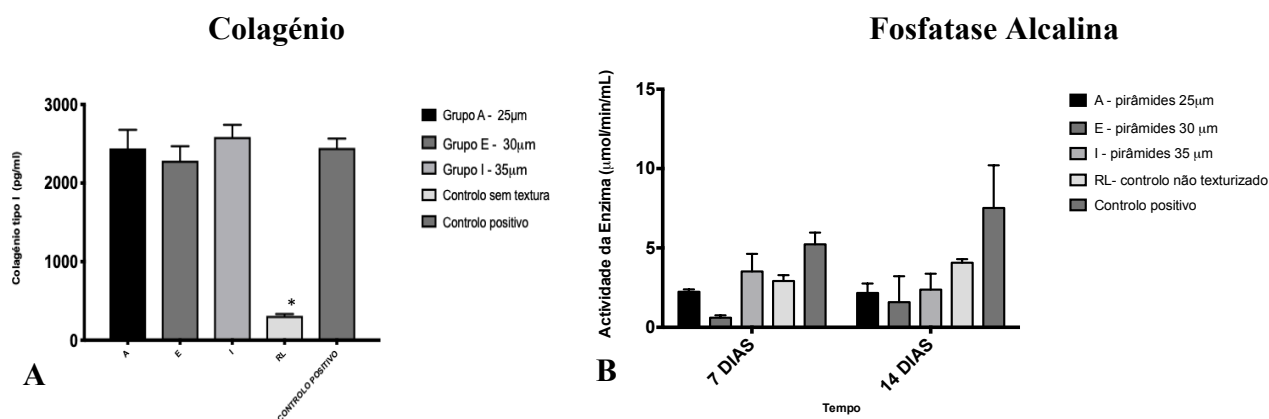


Gráfico 2 – Resultados (A) da produção de colagénio tipo I ( $n=3$ ) aos 3 dias de cultura e (B) da atividade da fosfatase alcalina ( $n=2$ ) aos 7 e 14 dias de cultura como média  $\pm$  desvio padrão em valores pg/mL e  $\mu\text{mol/min/mL}$ , respetivamente dos grupos A, E, I, RL e controlo positivo. O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo:  $*p<0,05$ .

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo e o controlo relativamente à atividade da ALP aos 7 e aos 14 dias ( $p>0,05$ ).

## 1.2.Sulcos

Todos os grupos apresentaram um aumento da viabilidade celular do primeiro para os 14 dias, à exceção do grupo RL que foi significativamente inferior aos 7 e 14 dias ( $p<0,05$ ).

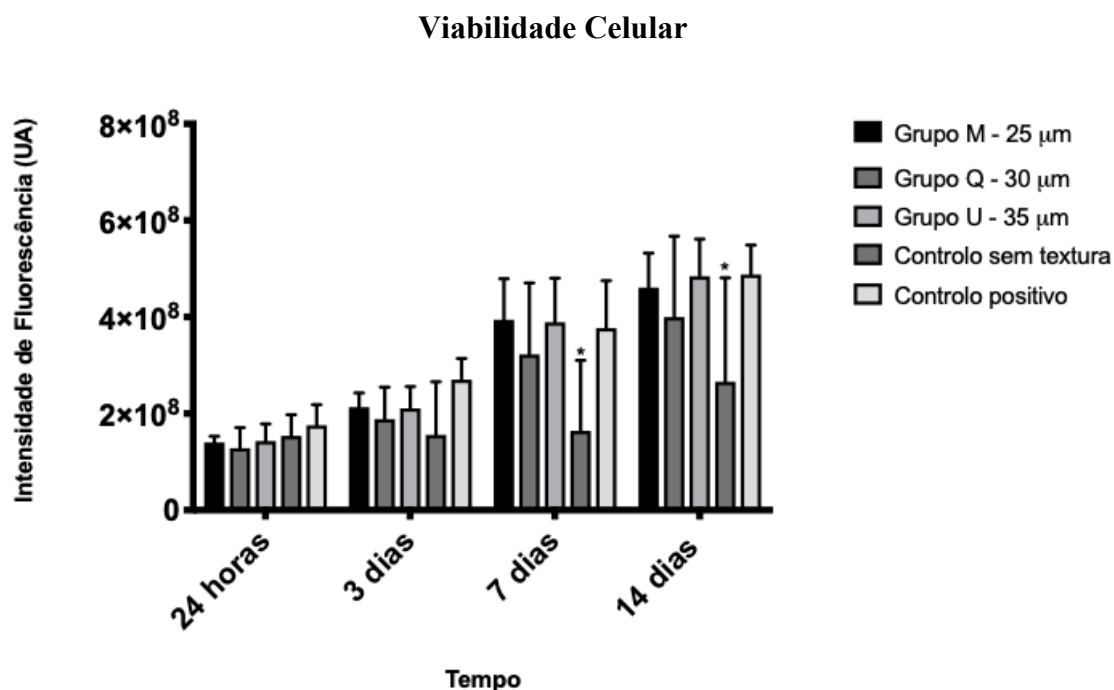


Gráfico 3 - Resultados de viabilidade celular como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos M, Q e U, controlo sem textura e controlo positivo aos 1, 3, 7 e 14 dias de cultura ( $n=15$ ). O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo:  $*p<0,05$ .

Os níveis de colagénio foram significativamente superiores nos grupos com tratamento laser quando comparados com o controlo sem tratamento ( $p<0,05$ ). Contudo, não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo (M, Q, U) ( $p>0,05$ ).

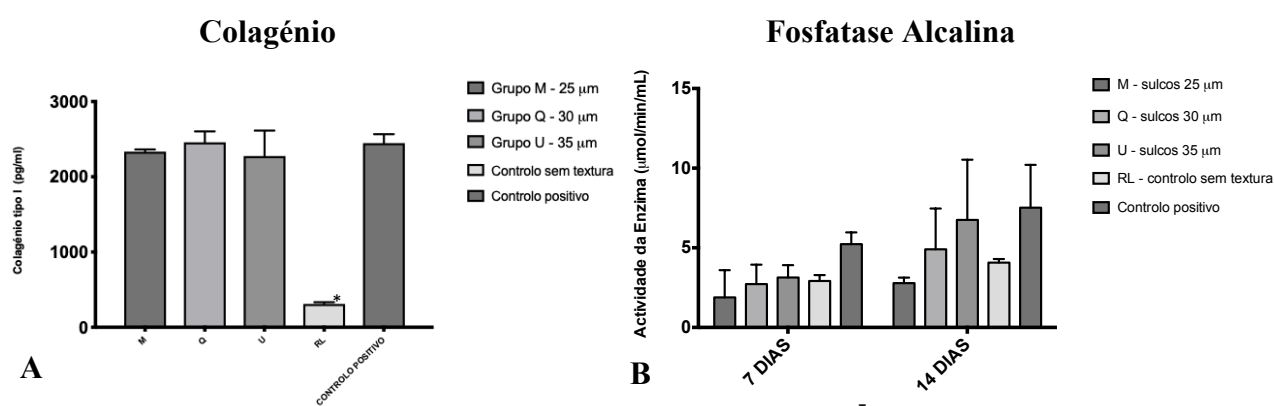


Gráfico 4 – Resultados (A) da produção de colagénio tipo I ( $n=3$ ) aos 3 dias de cultura e (B) da atividade da fosfatase alcalina ( $n=2$ ) aos 7 e 14 dias de cultura como média  $\pm$  desvio padrão em valores pg/mL e µmol/min/mL, respetivamente dos grupos M, Q, U, RL e controlo positivo. O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo:  $*p<0,05$ .

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na atividade da ALP entre os grupos de estudo e o controlo nem entre grupos de estudo relativamente aos 7 e aos 14 dias ( $p>0,05$ ).

Uma vez que não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes espaçamentos das passagens de laser, optou-se por utilizar o espaçamento de 25µm para avaliação das restantes variáveis: textura e número de passagens de laser.

## Objetivo 2 – Avaliar a influência da textura no comportamento celular

### Viabilidade Celular

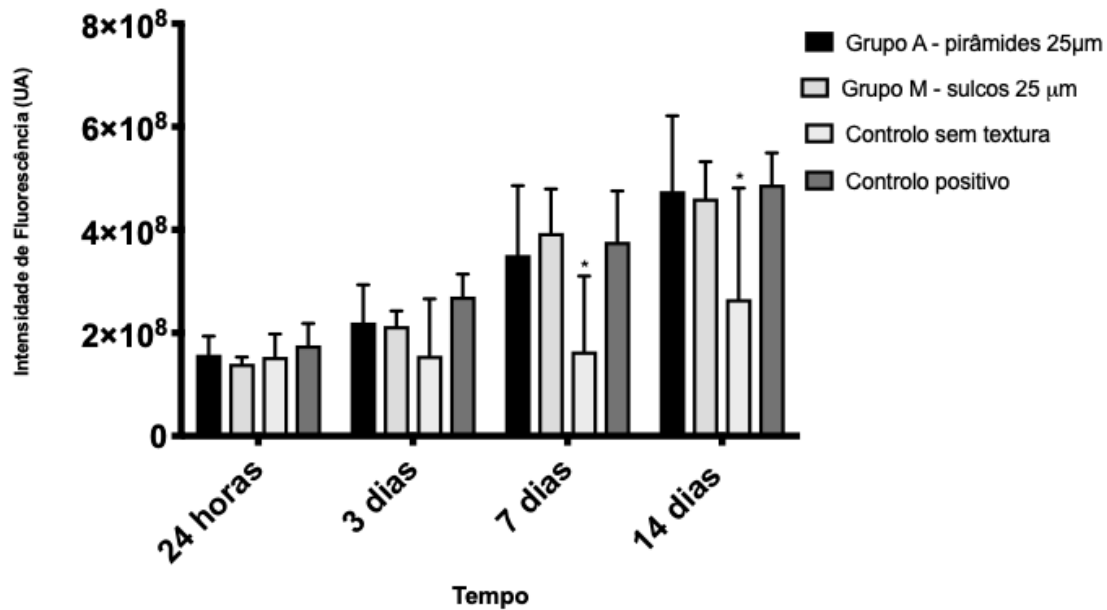
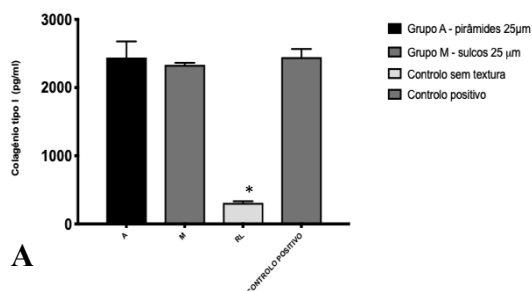


Gráfico 5 - Resultados de viabilidade celular como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos A e M, controle sem textura e controle positivo aos 1, 3, 7 e 14 dias de cultura ( $n=15$ ). O controle positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: \* $p<0,05$ .

Os grupos com tratamento de laser (A e M) demonstraram resultados de viabilidade significativamente superiores ao grupo sem tratamento aos 7 e 14 dias ( $p<0,05$ ), mas sem diferenças entre eles ( $p>0,05$ ). Contudo, todos os grupos demonstraram valores crescentes ao longo do tempo (gráfico 5).

### Colagénio



### Fosfatase Alcalina

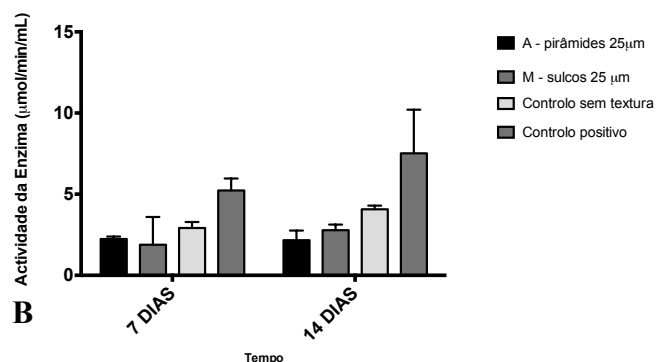


Gráfico 6 – Resultados (A) da produção de colagénio tipo I ( $n=3$ ) aos 3 dias de cultura e (B) da atividade da fosfatase alcalina ( $n=2$ ) aos 7 e 14 dias de cultura como média  $\pm$  desvio padrão em valores pg/mL e  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ , respetivamente dos grupos A, M, RL e controle positivo. O controle positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: \* $p<0,05$ .

Aos 3 dias de cultura, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nos valores da produção de colagénio tipo I entre as diferentes texturas ( $p>0,05$ ). Estes valores foram significativamente superiores ao grupo sem textura ( $p<0,05$ ), contrariamente ao observado na atividade da ALP aos 7 e 14 dias ( $p>0,05$ ). Observou-se que, à exceção do grupo A, a atividade aumentou dos 7 para os 14 dias (gráfico 6).

### Objetivo 3 – Avaliar a influência do número de passagens de laser no comportamento celular

#### 3.1. Pirâmides

Todos os grupos apresentaram um aumento da viabilidade celular ao longo do tempo com valores significativamente superiores nos grupos de estudo em comparação com os discos sem textura (RL) aos 7 e 14 dias de cultura ( $p<0,05$ ). Não se verificaram diferenças significativas entre grupos de estudo ( $p>0,05$ ).

#### Viabilidade Celular

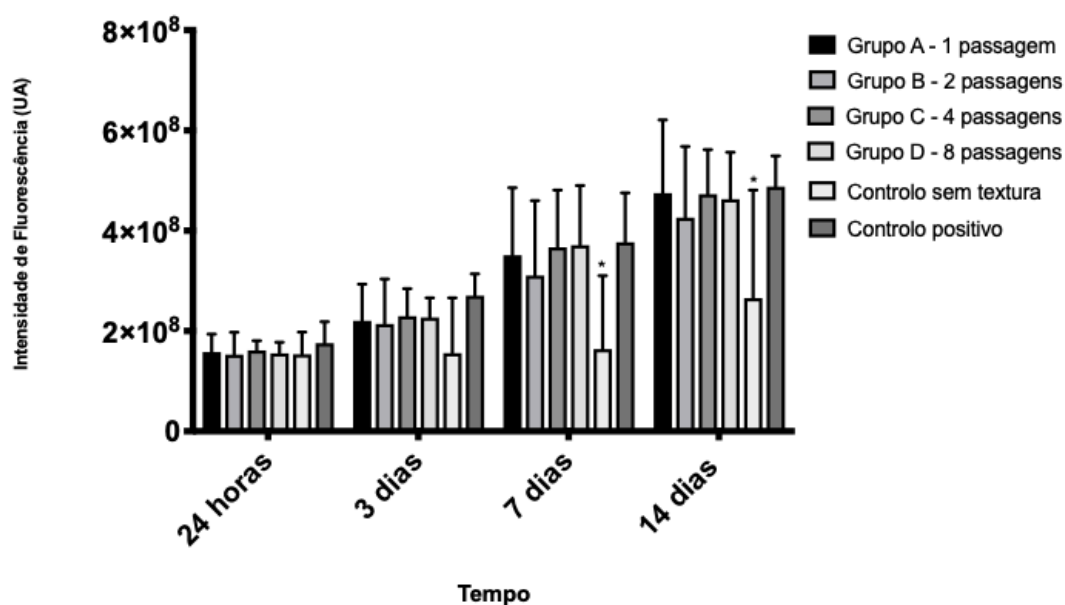


Gráfico 7 - Resultados de viabilidade celular como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos A, B, C e D, controlo sem textura e controlo positivo aos 1, 3, 7 e 14 dias de cultura ( $n=15$ ). O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: \*  $p<0,05$ .

De acordo com o gráfico 8, o número de passagens de laser não parece influenciar a produção de colagénio tipo I ( $p>0,05$ ). Contudo, encontraram-se valores significativamente superiores nos grupos com tratamento de laser em relação ao grupo sem tratamento ( $p<0,05$ ).

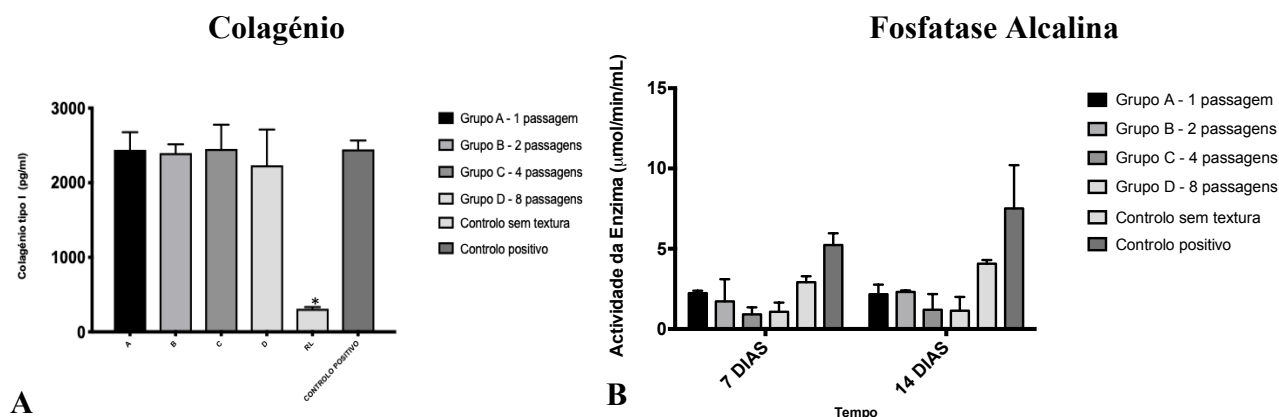


Gráfico 8 – Resultados (A) da produção de colagénio tipo I ( $n=3$ ) aos 3 dias de cultura e (B) da atividade da fosfatase alcalina ( $n=2$ ) aos 7 e 14 dias de cultura como média  $\pm$  desvio padrão em valores pg/mL e  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ , respetivamente dos grupos A, B, C, D, RL e controlo positivo. O controlo positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo: \* $p<0,05$ .

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na atividade da ALP entre o número de passagens, e estas e o grupo controlo sem textura ( $p>0,05$ ) aos 7 e aos 14 dias.

### 3.2. Sulcos

#### Viabilidade Celular

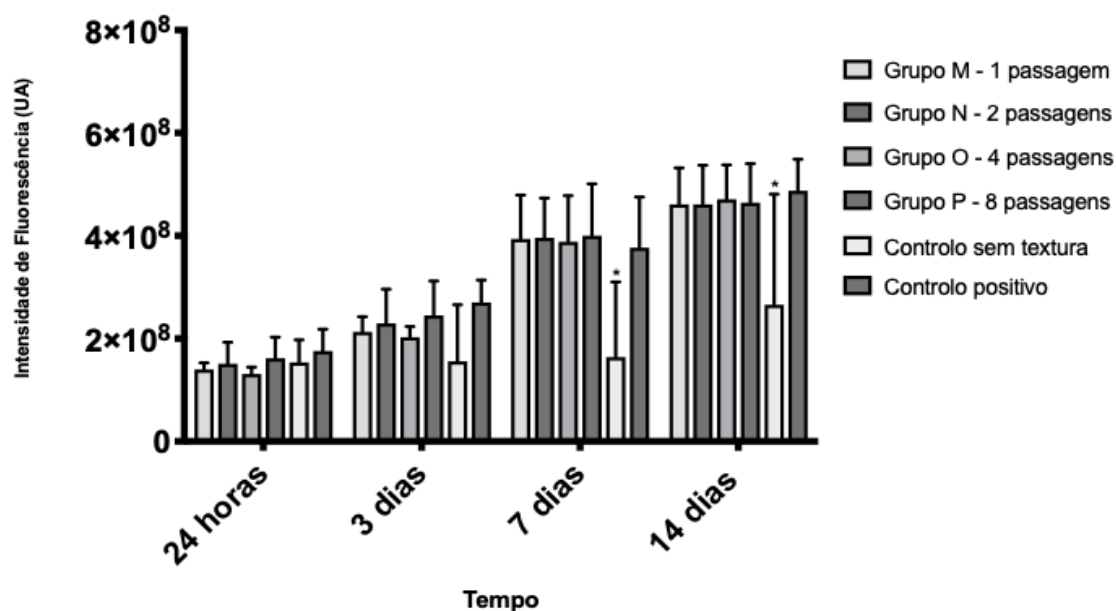


Gráfico 9 - Resultados de viabilidade celular como média  $\pm$  desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos M, N, O e P, controle sem textura e controle positivo aos 1, 3, 7 e 14 dias de cultura ( $n=15$ ). O controle positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo:  $*p<0,05$ .

De acordo com os resultados observados no gráfico 9, todos os grupos apresentaram um aumento da viabilidade celular ao longo do tempo, embora sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos texturizados por laser ( $p>0,05$ ). No entanto, aos 7 e 14 dias verificaram-se valores significativamente superiores nos grupos tratados com laser em comparação com o controle sem textura ( $p<0,05$ ).

Os níveis de colagénio I foram significativamente superiores em todos os grupos quando comparados com o controle sem tratamento de laser ( $p<0,05$ ).

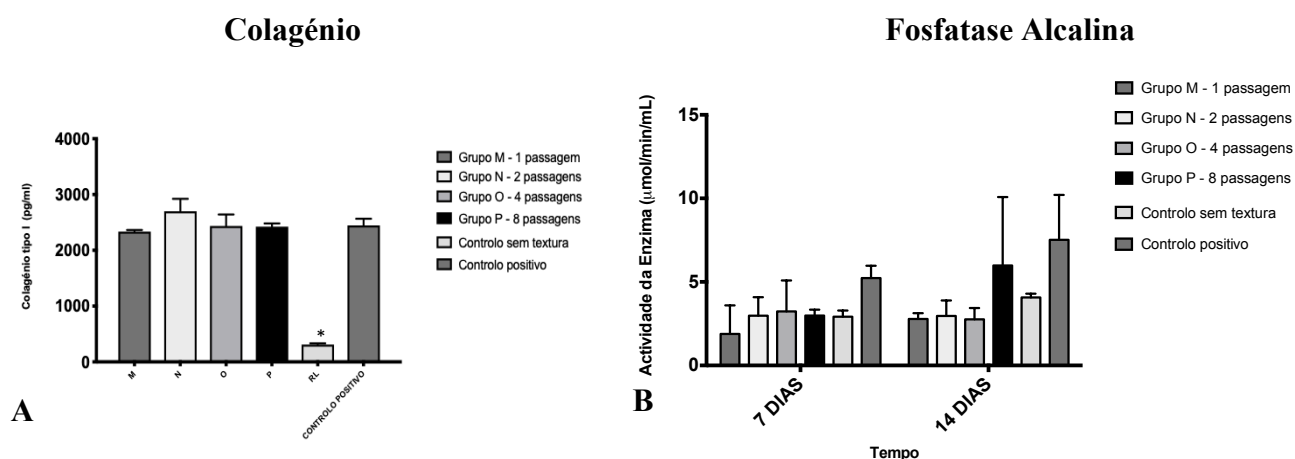


Gráfico 10 – Resultados (A) da produção de colagénio tipo I ( $n=3$ ) aos 3 dias de cultura e (B) da atividade da fosfatase alcalina ( $n=2$ ) aos 7 e 14 dias de cultura como média  $\pm$  desvio padrão em valores pg/mL e  $\mu\text{mol/min/mL}$ , respetivamente dos grupos M, N, O, P, RL e controle positivo. O controle positivo é colocado meramente para validação das condições experimentais. Estatisticamente significativo:  $*p<0,05$ .

A atividade da fosfatase alcalina não parece ser influenciada pelo grupo de passagens de laser. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $p>0,05$ ).

## Visualização das diferentes superfícies e adesão e comportamento celular às 24h por FEG-SEM

As imagens apresentadas foram obtidas por microscopia eletrônica de varrimento das superfícies de todos os grupos testados (A, B, C, D, E, I, M, N, O, P, Q, U e RL) sem células e ao primeiro dia de cultura. Em todas as superfícies é possível a visualização da adesão celular após 24 horas. Verifica-se que nos grupos com textura de sulcos, as expansões celulares da membrana plasmática (filipódias) seguem a orientação dos sulcos na maioria das amostras, sendo este efeito particularmente notório nas amostras M e N. Na textura de pirâmide é possível observar o estabelecimento de contactos celulares ao nível do vértice das pirâmides, com mudança de conformação da célula para uma forma mais prismática, característica da morfologia osteoblástica (evidente nas amostras E e I). No entanto, a conformação celular parece sempre seguir uma orientação linear, em que o longo eixo está alinhado com o padrão.

Imagem inicial

hFOB 24h

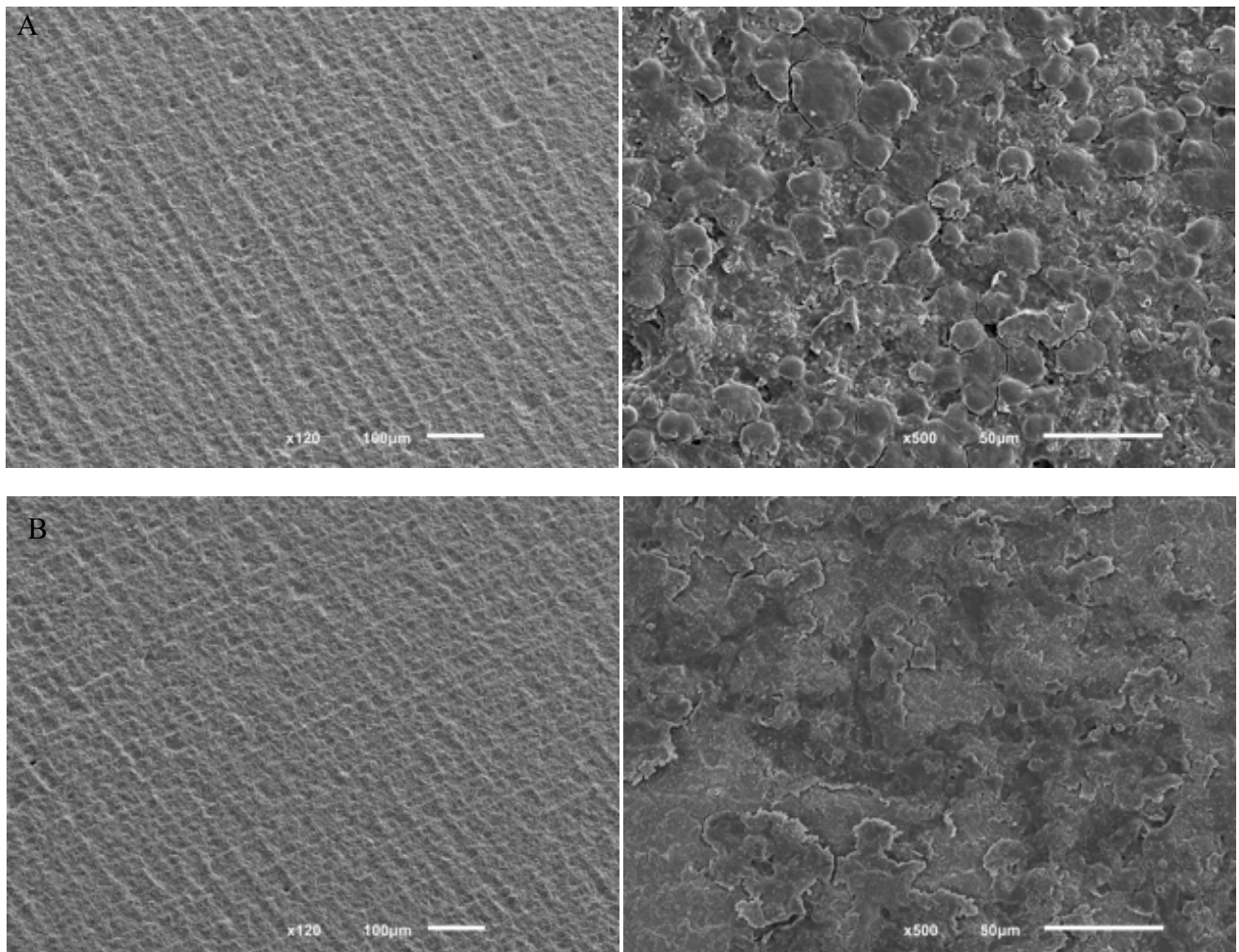


Imagem inicial

hFOB 24h

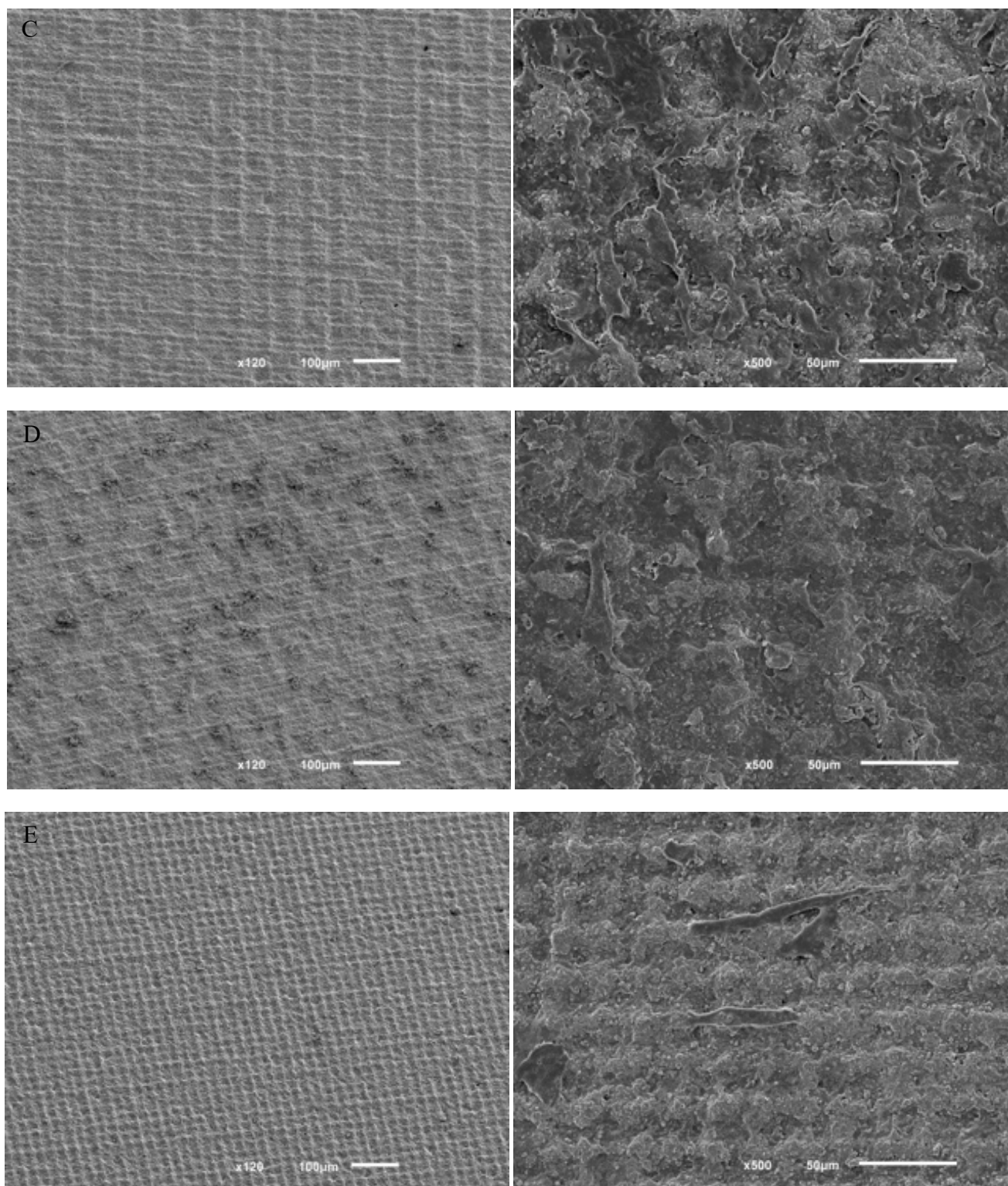




Imagem inicial

hFOB 24h

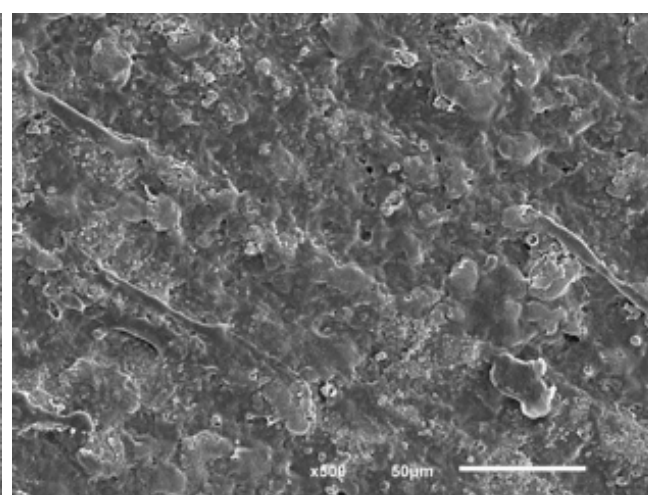
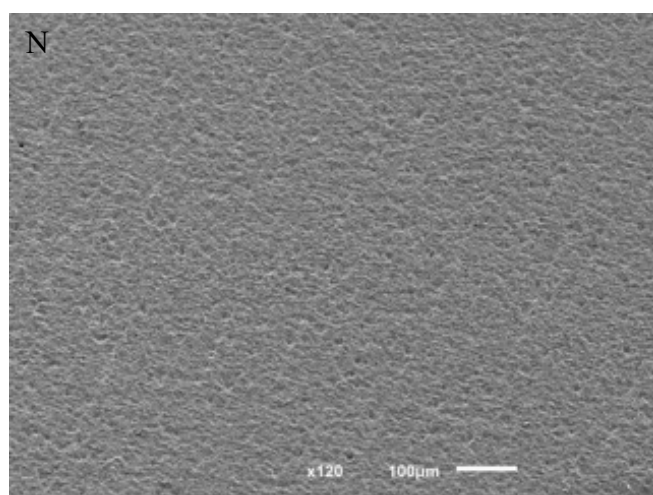
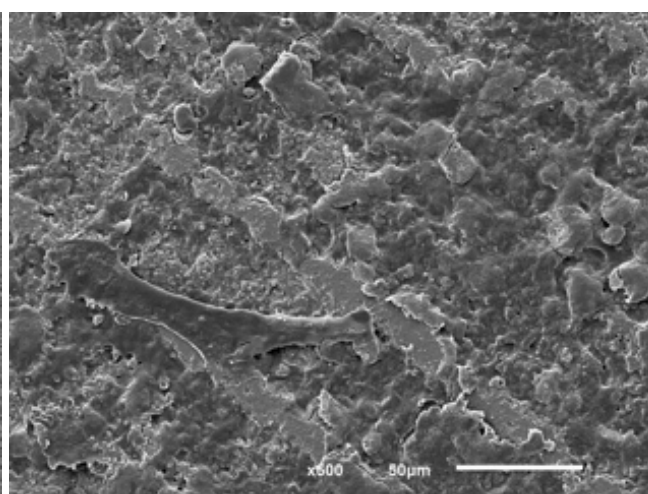
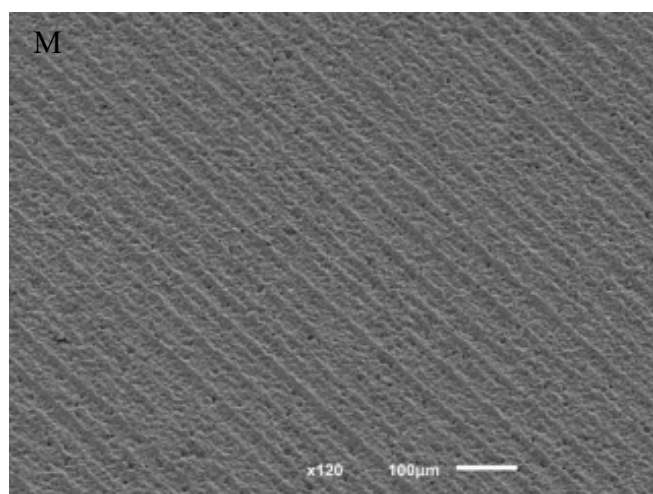
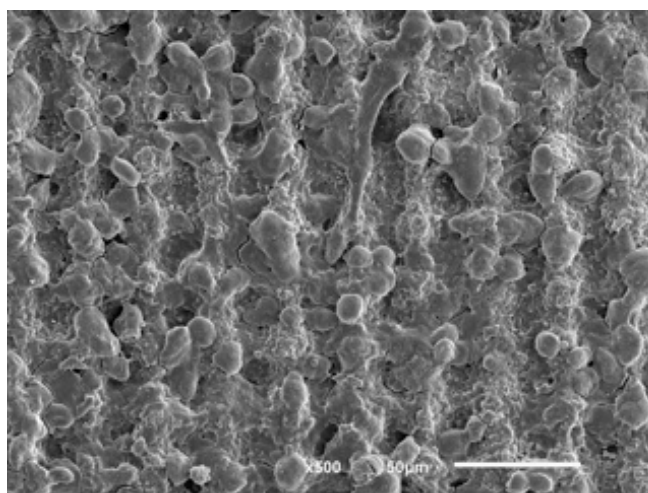
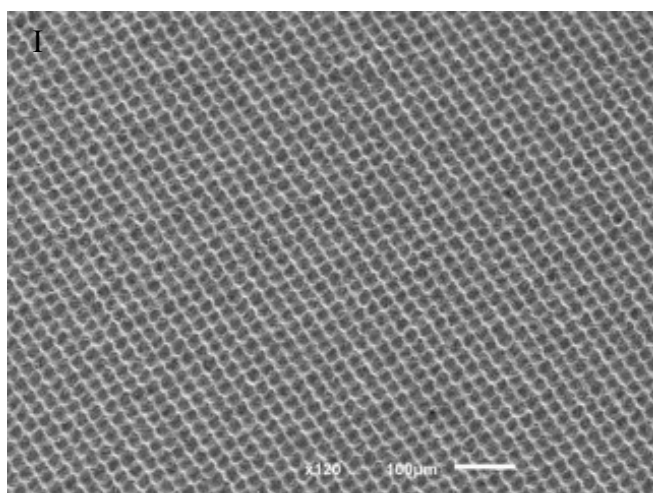


Imagem inicial

hFOB 24h

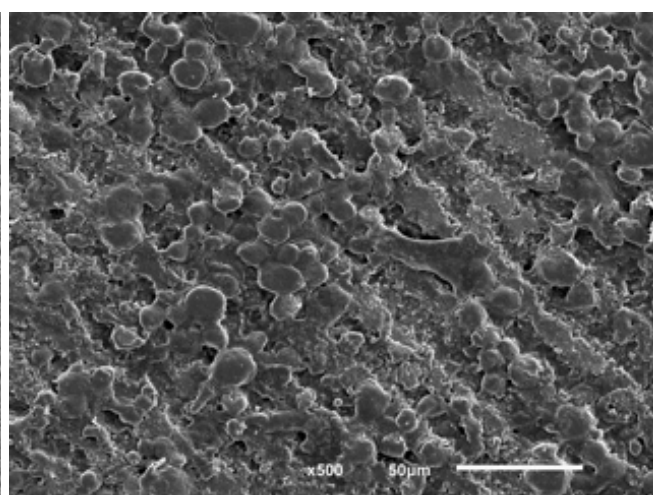
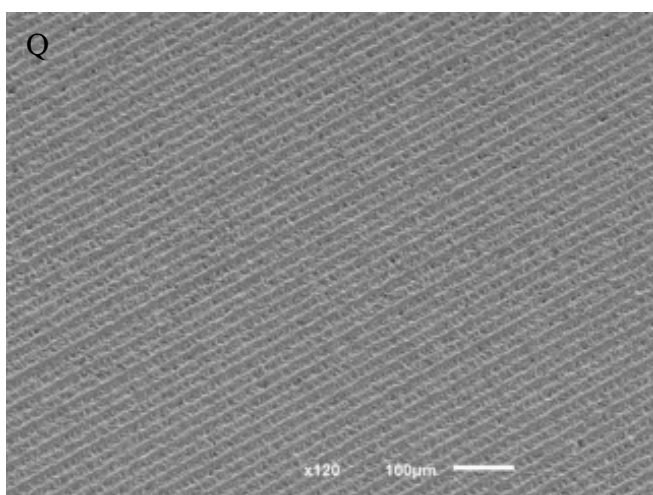
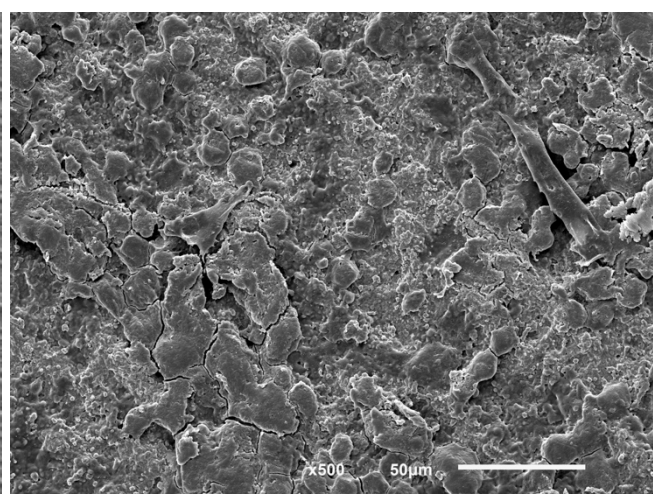
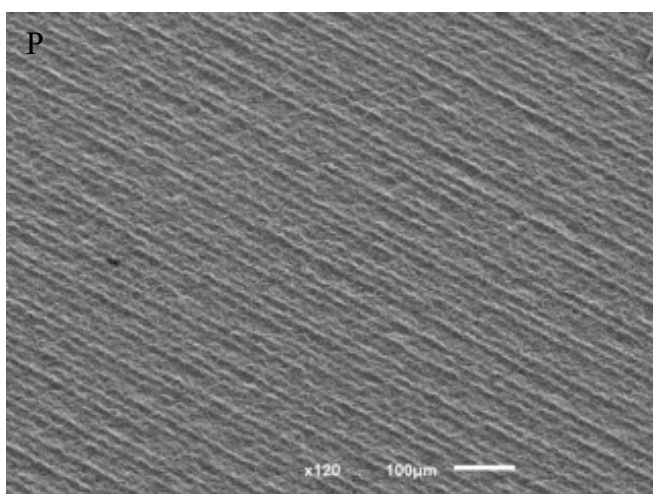
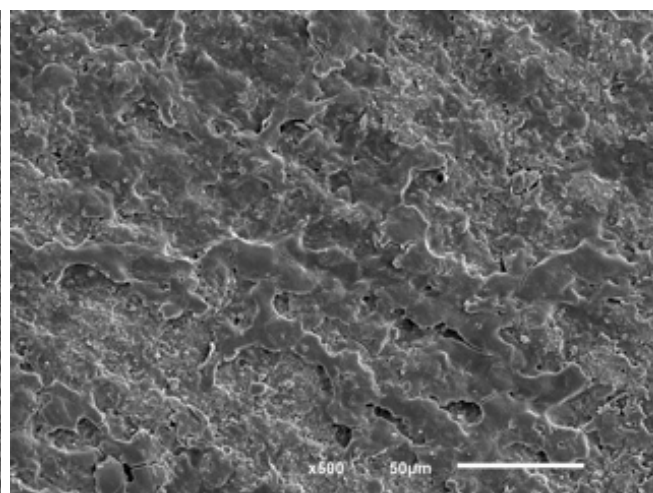
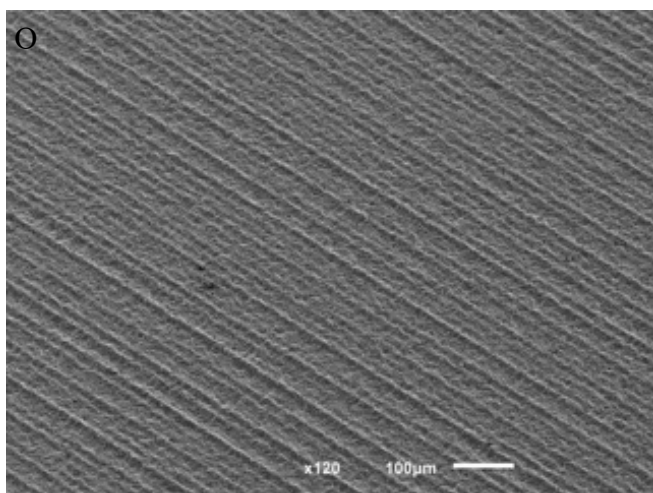
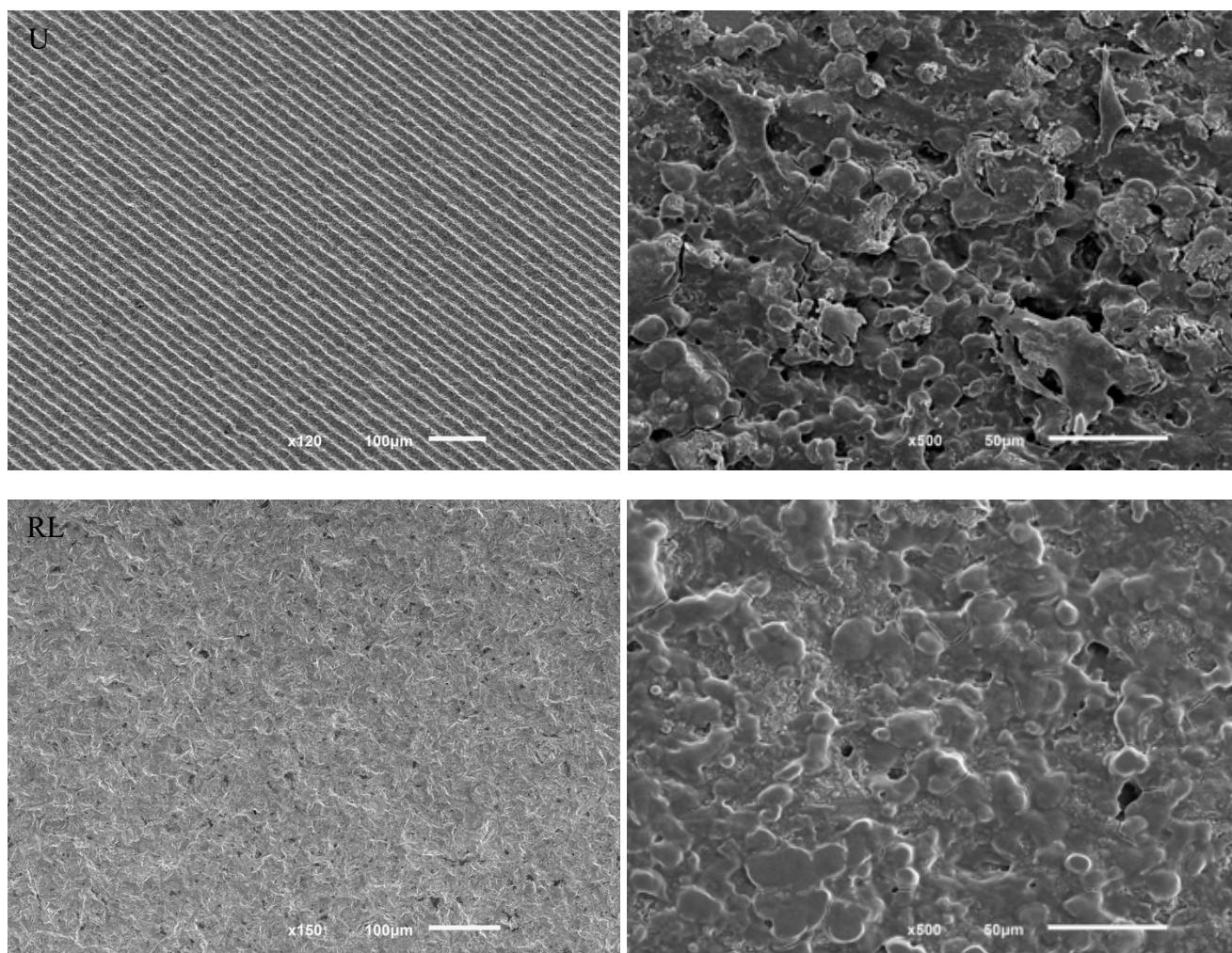


Imagem inicial

hFOB 24h



*Figura 1 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (FEG-SEM) inicial e após o primeiro dia de cultura das superfícies dos grupos A, B, C, D, E, I, M, N, O, P, Q, U e RL. Ampliações 120x e 500x. Podem ser observadas imagens adicionais com diferentes ampliações nos anexos.*

## DISCUSSÃO

O objetivo científico deste trabalho pretendia contribuir para o esclarecimento do comportamento celular *in vitro* de células fetais humanas (hFOB) em contacto com diferentes superfícies de zircónia, e deste modo, aumentar o suporte científico no que respeita a colonização celular de superfícies de zircónia tratadas com recurso a uma micro texturização por laser Nd:YAG. As técnicas e protocolos, assim como o modelo celular utilizados estão amplamente validados para o estudo do comportamento celular ósseo em superfícies implantares. (20, 27, 45).

Verificou-se, independentemente das variáveis estudadas, uma melhor resposta celular nos grupos de estudo com tratamento de laser comparativamente ao grupo de controlo sem tratamento, nomeadamente no que diz respeito à viabilidade celular e à produção de colagénio. É de referir que as amostras de controlo do presente estudo foram tratadas com recurso a jateamento com partículas de alumina e ataque ácido, por forma a produzir uma rugosidade e química superficiais semelhantes às superfícies *gold standard* atualmente utilizadas na Implantologia, tendo por base estudos prévios realizados pelo consórcio de investigação. (20, 45) Estes resultados são consistentes com outros estudos *in vitro* onde se verificou proliferação celular significativamente superior no grupo de teste – tratado com laser – aos 7 e aos 15 dias. (18, 21) O aumento da densidade celular poderá ser explicado pelo aumento da rugosidade das superfícies tratadas com laser, que resulta num aumento da superfície de contacto entre as células e o material. (12, 18, 21) Outra explicação poderá ser o facto de as células serem atraídas para o interior dos sulcos devido à presença de nanorugosidades, que são facilmente reconhecidas pelas projeções citoplasmáticas. (46, 47) Por outro lado, os sulcos podem servir como depósitos para as proteínas presentes no meio de cultura, melhorando o estabelecimento de contacto e adesão celular à superfície do implante. (48)

A fosfatase alcalina é um indicador sistémico de formação óssea e, consequentemente, um marcador de fase inicial de diferenciação osteogénica. (20) Contudo, não foram observadas diferenças na sua atividade avaliada aos 7 e 14 dias o que implica que todos os grupos apresentaram a mesma atividade funcional osteoblástica inicial. Nos estudos de Delgado-Ruiz *et al.* e Rezaei *et al.* observaram-se valores significativamente superiores no grupo de teste (sulcos produzidos com laser em zircónia) nos dois tempos de medição, o que não se encontra de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. (10, 21) Seria de esperar então, valores superiores para os grupos tratados com laser tendo em conta que os mesmos apresentam valores superiores de viabilidade celular e produção de colagénio aumentada em cerca de 10 vezes, o

que sugere diferenciação osteoblástica. (10) No entanto, outros estudos, como o estudo de Taniguchi *et al.*, reportam um decréscimo da atividade da ALP dos 7 para os 14 dias sem diferenças significativas entre as superfícies de teste e de controlo. (18) Não se verificou no nosso estudo este decréscimo, que poderá ser explicado pela produção de osteocalcina pelos osteoblastos bem diferenciados, que é um inibidor da produção de matriz. (18) No entanto, a dimensão da amostra utilizada no teste de ALP foi reduzida face aos outros testes realizados, e poderá não ter sido suficiente para detetar eventuais diferenças entre grupos.

Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos de estudo – textura unidirecional ou bidirecional – em nenhuma das variáveis testadas, o que sugere que diferentes espaçamentos, texturas e número de passagens não alteram significativamente a superfície de modo a influenciar a resposta celular e, portanto, indicia que todas as superfícies de estudo são suscetíveis de induzir a formação óssea e a consequente osteointegração *in vivo*. As distâncias utilizadas como espaçamento neste estudo foram 25µm, 30µm e 35µm e, portanto, seria de esperar que não existissem diferenças significativas entre as mesmas, já que a diferença entre elas é muito reduzida. Um estudo *in vitro* constatou um espaçamento de 70µm e uma profundidade sulcular de 30µm como dimensões ótimas para guiar o crescimento osteoblástico. (5) No entanto, esta questão está longe de ser consensual, existindo uma ampla variedade de nano ou microtopografias variando desde as centenas de nm até às dezenas de micrómetros obtidas por técnicas diversificadas e levando a, na maioria dos casos, resultados biológicos interessantes e promissores. No entanto, apenas uma pequena seleção de parâmetros relacionados com a resposta celular é avaliada nestes trabalhos. (10, 48) Seria de interesse investigar de forma exaustiva, o potencial impacto do aumento do espaçamento ou, alternativamente, da sua diminuição a uma escala nanométrica, de acordo com os resultados da literatura (10), e utilizando métodos de caracterização do comportamento celular mais completos.

No que diz respeito à textura, o tratamento laser tem sido aplicado na maioria dos estudos para criação de sulcos. Um estudo animal observou que implantes de zircónia com sulcos criados por técnica de laser apresentaram elevado número de fibras de colagénio transversais e um aumento da remodelação óssea quando comparado com implantes de zircónia jateados que apresentaram fibras paralelas. (49) No presente estudo foram criadas 2 texturas: sulcular, mais caracterizada na literatura e, uma nova superfície, que consiste na formação de pirâmides truncadas através de criação de sulcos em 2 direções (horizontal e vertical). As pirâmides tornam-se cada vez mais claras, bem separadas com o aumento da profundidade dos

sulcos que as delimitam. (50) Este novo desenho de material baseia-se na estrutura do microambiente do tecido ósseo, que providencia guias de migração e adesão celular multidirecionais, mais relevantes biomimeticamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na viabilidade ou diferenciação celular de hFOB1.19 entre os dois padrões de textura, o que parece indicar que esta poderá ser irrelevante para o comportamento celular, ou que as texturas testadas produzem comportamentos equivalentes, que poderão ser melhorados através de estratégias distintas. Um aspeto interessante, observável nas imagens de microscopia SEM é o facto de, independentemente da textura aplicada, as células estabelecerem contactos com a superfície seguindo um alinhamento longitudinal face ao seu longo eixo, o que não foi observado nas amostras sem textura. O conhecimento da rugosidade média dos dois padrões seria fundamental para esclarecer esta questão.

A profundidade dos sulcos/pirâmides não foi controlada neste estudo. Sabe-se, porém, que o número de passagens de laser é diretamente proporcional ao aumento destas. (38) Como referido anteriormente, foram utilizadas múltiplas passagens de laser para produzir sulcos mais profundos, como alternativa ao aumento de intensidade do feixe de laser na zircónia, visando reduzir ou mesmo eliminar o risco de lesão mecânica induzida pelo aumento de intensidade do feixe de laser. (34) Os resultados do presente estudo sugerem que o número de passagens, embora leve à produção de sulcos de maior profundidade (conforme constatável nas imagens iniciais de FEG-SEM das amostras A, B, C e D – Figura 1), não parece afetar significativamente a resposta celular, considerando a viabilidade e a diferenciação osteoblástica. Estudos futuros deverão caracterizar de forma mais completa a relação entre o número de passagens e a profundidade do sulco produzido em 3Y-TZP, embora quer em sulcos unidirecionais, quer em sulcos cruzados, esta não pareça interferir significativamente com a resposta celular, em larguras de 25-35  $\mu\text{m}$ .

Em comparação com as células cultivadas nas superfícies de controlo de zircónia não texturizada, as células nos grupos de teste apresentaram forma mais alongada com os filamentos na direção da topografia às 24h em cultura quando observadas em FEG-SEM, nomeadamente nos grupos com textura sulcular. Estas observações foram também constatadas noutros estudos, embora utilizando Titânio como material de base. (10, 16, 18, 26) Sabe-se que interações dinâmicas célula-matriz celular determinam o alinhamento dos osteoblastos e das suas fibras de colagénio. No entanto, o mecanismo através do qual a topografia pode modelar o alinhamento dos osteoblastos e as fibras de colagénio continua ainda pouco conhecido. (16)

Este trabalho resulta de uma parceria com o Departamento de Engenharia de Matérias da Universidade do Minho no âmbito da qual está em curso a avaliação das propriedades



mecânicas das amostras. Seria de maior interesse a apresentação destes dados mecânicos, assim como da rugosidade das superfícies após o tratamento com laser, contudo não foi possível dispor destes dados no horizonte temporal deste trabalho, por esta não estar ainda concluída. Outra limitação foi ausência de amostras lisas e amostras de titânio como controlos correspondentes aos materiais de referência ou *gold standard*. Por fim, e dado o número limitado de amostras por grupo disponível, houve necessidade de reutilização das amostras entre ensaios, com recurso a protocolos de descontaminação enzimática e ultrassónica, seguida de esterilização por autoclavagem. Embora tenha sido já demonstrado pela equipa do CMEM que estes tratamentos não parecem induzir alterações nas propriedades mecânicas das amostras (resultados não publicados), existe algum risco de viés associado a este processo, nomeadamente pela potencial contaminação das amostras com remanescentes da matriz orgânica produzida nas culturas anteriores. Em estudos futuros, idealmente o número de espécimes disponíveis para cada grupo deverá ser superior por forma a eliminar a necessidade de reutilização das amostras.

Por forma a confirmar estes resultados, os estudos subsequentes deverão incluir um número de amostras superior, em particular para indicadores de diferenciação como ALP e colagénio tipo I, bem como incluir marcadores de diferenciação tardios como a osteonectina e a osteocalcina. Será importante uma caracterização celular mais extensiva *in vitro*, nomeadamente através da utilização de outro tipo de células representativas de tecidos moles peri-implantares, tais como fibroblastos ou queratinócitos, e também a utilização de células primárias. Por outro lado, embora constitua uma ferramenta importante na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares, a informação proveniente de estudos *in vitro* é necessariamente limitada, pelo que deverão ser futuramente considerados estudos *in vivo* com um *follow-up* prolongado, que avaliem a resposta celular em implantes sob carga e integrados em sistemas biológicos mais complexos.

## CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, pode concluir-se que a resposta biológica celular a superfícies de zircónia jateadas com partículas de alumina e tratadas com ataque ácido pode ser aumentada pela criação de texturas superficiais micrométricas através de laser Nd:YAG, com promoção de proliferação e diferenciação celular osteoblástica comparativamente a superfícies não texturizadas. No entanto, os diferentes espaçamentos/periodicidades da textura, tipos de textura (unidirecional ou bidirecional) e o maior número de passagens de laser testados neste estudo, não parecem influenciar significativamente a viabilidade celular ou expressão de marcadores de diferenciação, embora induzam modificações da morfologia celular dependentes das características de textura.



## BIBLIOGRAFIA

1. Manzano G, Herrero LR, Montero J. Comparison of clinical performance of zirconia implants and titanium implants in animal models: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29(2):311-20.
2. Kohal RJ, Weng D, Bachle M, Strub JR. Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment. *J Periodontol*. 2004;75(9):1262-8.
3. Von Wilmschütz C, Moest T, Nkenke E, Stelzle F, Schlegel KA. Implants in bone: part I. A current overview about tissue response, surface modifications and future perspectives. *Oral Maxillofac Surg*. 2014;18(3):243-57.
4. Cionca N, Hashim D, Mombelli A. Zirconia dental implants: where are we now, and where are we heading? *Periodontol 2000*. 2017;73(1):241-58.
5. Mesquita PF, A.; Raposo, H.; Afonso, A. Avaliação in vitro do comportamento de osteoblastos sobre implantes com diferentes tratamentos de superfície. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*. 2015;56(2):95-102.
6. Kuroda K, Okido M. Hydroxyapatite coating of titanium implants using hydroprocessing and evaluation of their osteoconductivity. *Bioinorg Chem Appl*. 2012;2012:730693.
7. Wenz HJ, Bartsch J, Wolfart S, Kern M. Osseointegration and clinical success of zirconia dental implants: a systematic review. *Int J Prosthodont*. 2008;21(1):27-36.
8. Laranjeira MS, Carvalho A, Pelaez-Vargas A, Hansford D, Ferraz MP, Coimbra S, et al. Modulation of human dermal microvascular endothelial cell and human gingival fibroblast behavior by micropatterned silica coating surfaces for zirconia dental implant applications. *Sci Technol Adv Mater*. 2014;15(2):025001.
9. Cho YD, Shin JC, Kim HL, Gerelmaa M, Yoon HI, Ryoo HM, et al. Comparison of the osteogenic potential of titanium- and modified zirconia-based bioceramics. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):4442-52.
10. Rezaei NM, Hasegawa M, Ishijima M, Nakhaei K, Okubo T, Taniyama T, et al. Biological and osseointegration capabilities of hierarchically (meso-/micro-/nano-scale) roughened zirconia. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:3381-95.
11. Andreiotelli M, Wenz HJ, Kohal RJ. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20 Suppl 4:32-47.

12. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Abboud M, Ramirez-Fernandez MP, Mate-Sanchez de Val JE, Negri B, et al. Histologic and histomorphometric behavior of microgrooved zirconia dental implants with immediate loading. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014;16(6):856-72.
13. Hirano T, Sasaki H, Honma S, Furuya Y, Miura T, Yajima Y, et al. Proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on zirconia and titanium with different surface topography. *Dent Mater J.* 2015;34(6):872-80.
14. Al Qahtani WM, Schille C, Spintzyk S, Al Qahtani MS, Engel E, Geis-Gerstorfer J, et al. Effect of surface modification of zirconia on cell adhesion, metabolic activity and proliferation of human osteoblasts. *Biomed Tech (Berl).* 2017;62(1):75-87.
15. Apratim A, Eachempati P, Krishnappa Salian KK, Singh V, Chhabra S, Shah S. Zirconia in dental implantology: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015;5(3):147-56.
16. Zhu B, Lu Q, Yin J, Hu J, Wang Z. Alignment of osteoblast-like cells and cell-produced collagen matrix induced by nanogrooves. *Tissue Eng.* 2005;11(5-6):825-34.
17. Kohal RJ, Finke HC, Klaus G. Stability of prototype two-piece zirconia and titanium implants after artificial aging: an in vitro pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2009;11(4):323-9.
18. Taniguchi Y, Kakura K, Yamamoto K, Kido H, Yamazaki J. Accelerated Osteogenic Differentiation and Bone Formation on Zirconia with Surface Grooves Created with Fiber Laser Irradiation. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016;18(5):883-94.
19. Kim HK, Woo KM, Shon WJ, Ahn JS, Cha S, Park YS. Comparison of peri-implant bone formation around injection-molded and machined surface zirconia implants in rabbit tibiae. *Dent Mater J.* 2015;34(4):508-15.
20. Gabriella M. Penarrieta-Juanito MC, Mafalda Costa,, Georgina Miranda JM, Ricardo S. Magini,, Antonio Mata JCMS, João Caramês,, Silva FS. A novel gradated zirconia implant material embedding bioactive ceramics: physicochemical assessment and human osteoblast behavior. *Materialia.* 2018.
21. Delgado-Ruiz RA, Gomez Moreno G, Aguilar-Salvatierra A, Markovic A, Mate-Sanchez JE, Calvo-Guirado JL. Human fetal osteoblast behavior on zirconia dental implants and zirconia disks with microstructured surfaces. An experimental in vitro study. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(11):e144-e53.
22. Linares A, Grize L, Munoz F, Pippenger BE, Dard M, Domken O, et al. Histological assessment of hard and soft tissues surrounding a novel ceramic implant: a pilot study in the minipig. *J Clin Periodontol.* 2016;43(6):538-46.
23. Carvalho BMP, E. P.; Moraes, Falcón-Antenucci, R. M.; Júnior, J. S. F. Tratamentos de superfície nos implantes dentários. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-fac.* 2009;9(1):123-30.

24. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52(2):155-70.
25. Hao L, Lawrence J, Chian KS. Effects of CO<sub>2</sub> laser irradiation on the surface properties of magnesia-partially stabilised zirconia (MgO-PSZ) bioceramic and the subsequent improvements in human osteoblast cell adhesion. *J Biomater Appl*. 2004;19(2):81-105.
26. Ketabi M, Deporter D. The effects of laser microgrooves on hard and soft tissue attachment to implant collar surfaces: a literature review and interpretation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2013;33(6):e145-52.
27. Kohal RJ, Bachle M, Att W, Chaar S, Altmann B, Renz A, et al. Osteoblast and bone tissue response to surface modified zirconia and titanium implant materials. *Dental Materials*. 2013;29(7):763-76.
28. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res*. 2000;49(2):155-66.
29. Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AE, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17 Suppl 2:55-67.
30. Esposito M, Ardebili Y, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(7):CD003815.
31. Hafezeqoran A, Koodaryan R. Effect of Zirconia Dental Implant Surfaces on Bone Integration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9246721.
32. Sivaraman K, Chopra A, Narayan AI, Balakrishnan D. Is zirconia a viable alternative to titanium for oral implant? A critical review. *J Prosthodont Res*. 2018;62(2):121-33.
33. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20 Suppl 4:172-84.
34. Samant AN, & Dahotre, N. B. . Laser machining of structural ceramics—A review. *Journal of the European Ceramic Society*. 2009;29:969-93.
35. Dumas V, Rattner A, Vico L, Audouard E, Dumas JC, Naisson P, et al. Multiscale grooved titanium processed with femtosecond laser influences mesenchymal stem cell morphology, adhesion, and matrix organization. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(11):3108-16.
36. Coathup MJ, Blunn GW, Mirhosseini N, Erskine K, Liu Z, Garrod DR, et al. Controlled laser texturing of titanium results in reliable osteointegration. *J Orthop Res*. 2017;35(4):820-8.

37. Hervé Hidalgo ER, Eric Millon, Anne Lise Thomann, Jacky Mathias, et al.. Yttria - stabilized zirconia thin films deposited by pulsed-laser deposition and magnetron sputtering. *Surface and Coatings Technology*, Elsevier. 2011;205:4495-9.
38. Samant AN, & Dahotre, N. B. . Physical Effects of Multipass Two-Dimensional Laser Machining of Structural Ceramics. *Advanced Engineering Materials*. 2009;11(7):579-85.
39. Puckett S, Pareta R, Webster TJ. Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(2):229-41.
40. Peroglio A-MSQFCMSMAMAM. Femtosecond laser multi-patterning of zirconia for screening of cell-surface interactions. *Journal of the European Ceramic Society*. 2017.
41. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater*. 2012;24:1-17.
42. Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;228(1-2):79-102.
43. Lopes P. Desenvolvimento de texturas superficiais em ZrO<sub>2</sub> recorrendo a laser para aplicações biomédicas [Dissertação de Mestrado em Engenharia de Materiais]: Universidade do Minho; 2017.
44. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39(2):175-91.
45. da Cruz MB, Marques JF, Penarrieta-Juanito GM, Costa M, Souza JC, Magini RS, et al. Hard and Soft Tissue Cell Behavior on Polyetheretherketone, Zirconia, and Titanium Implant Materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2019;34(1):39-46.
46. Shah FA, Thomsen P, Palmquist A. Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. *Acta Biomater*. 2019;84:1-15.
47. Jeon H, Simon CG, Jr., Kim G. A mini-review: Cell response to microscale, nanoscale, and hierarchical patterning of surface structure. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(7):1580-94.
48. Dinca VS, L. E.; Rusen, L.; Bonciu, A.; Lipper, T.; Dinescu, M.; Farsari, M. Bio-Interfaces Engineering Using Laser-Based Methods for Controlled Regulation of Mesenchymal Stem Cell Response In Vitro. 2016. In: *Recent Advances in Biopolymers* [Internet]. [221-51].
49. Schunemann FH, Galarraga-Vinueza ME, Magini R, Fredel M, Silva F, Souza JCM, et al. Zirconia surface modifications for implant dentistry. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;98:1294-305.

50. Bairo F, Montealegre MA, Minguella-Canela J, C. V-B. Laser Surface Texturing of Alumina/Zirconia Composite Ceramics for Potential Use in Hip Joint Prosthesis. MDPI - Coatings. 2019;9(369).

## ANEXOS

Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (FEG-SEM) das superfícies dos grupos testados (A, B, C, D, E, I, M, N, O, P, Q, U e RL) ampliações 100x e 200x.

Imagem inicial

hFOB 24h

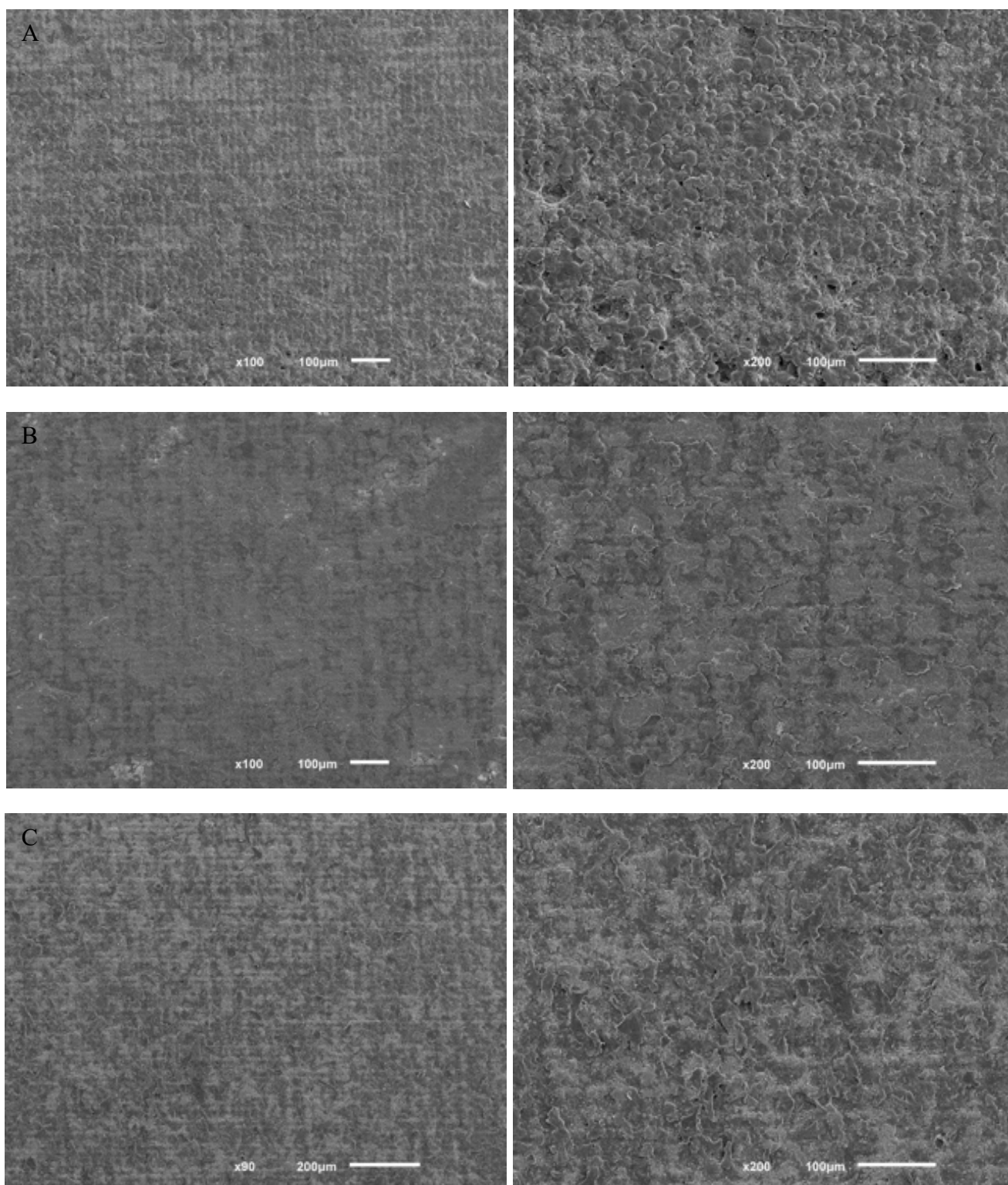


Imagem inicial

hFOB 24h

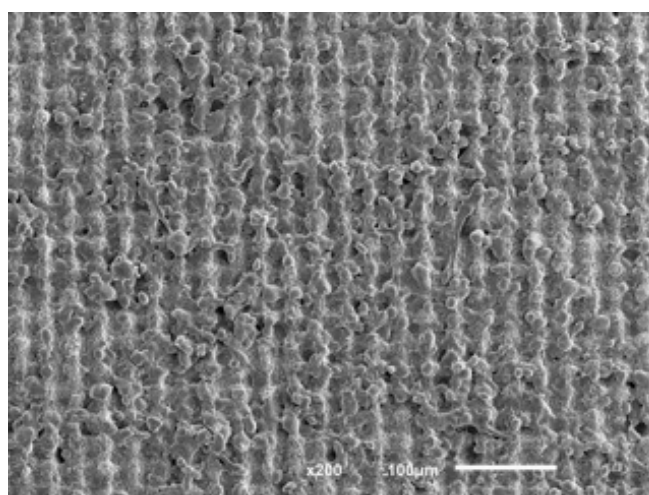
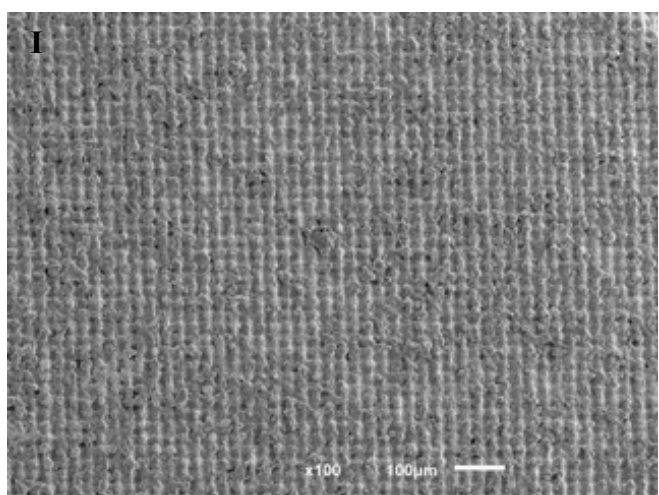
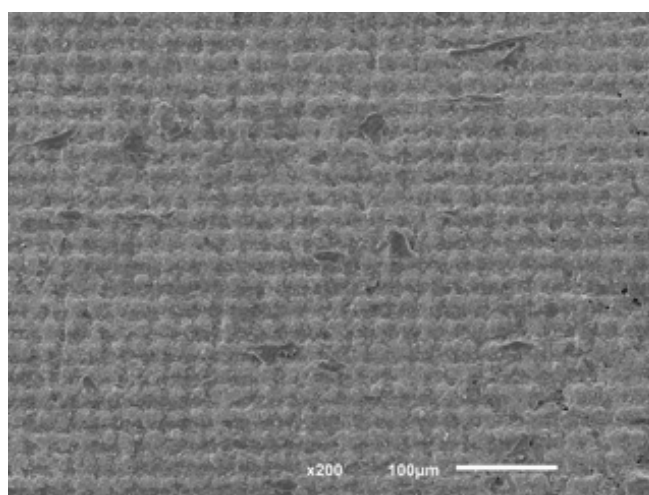
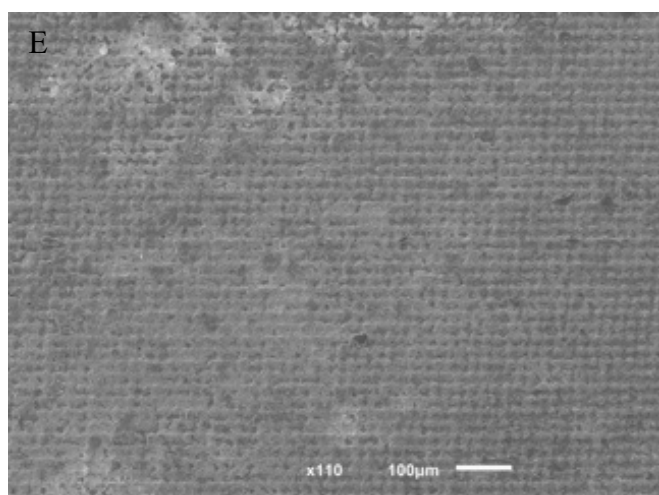
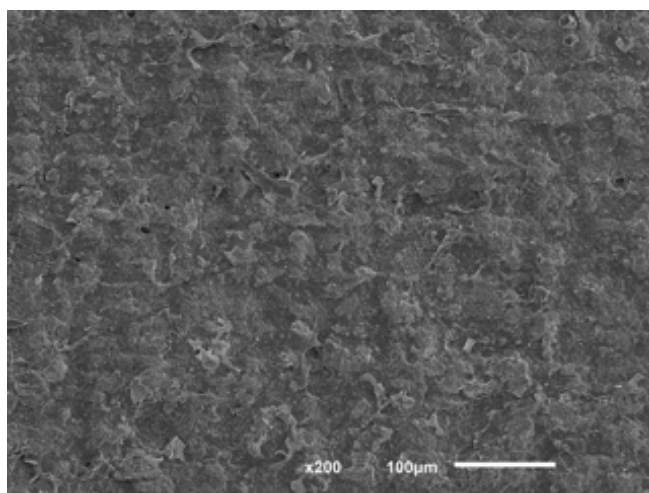
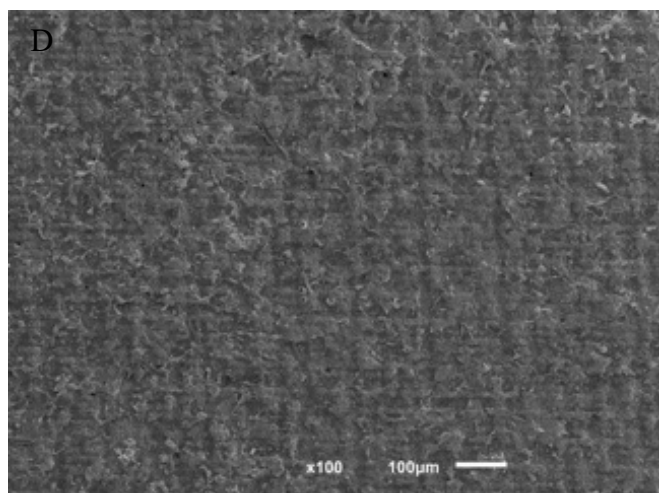




Imagem inicial

hFOB 24h

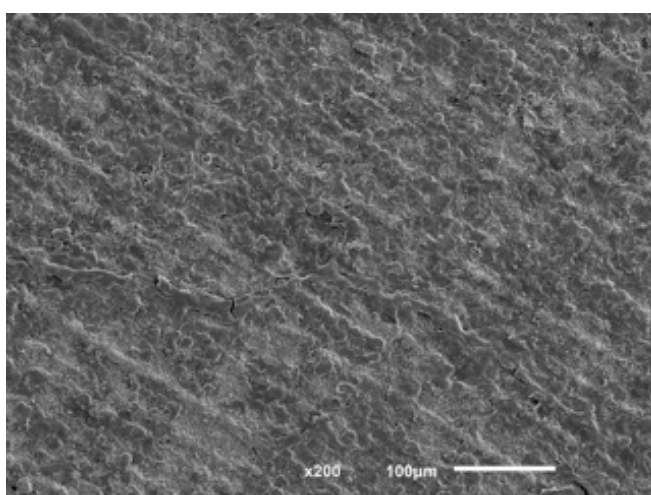
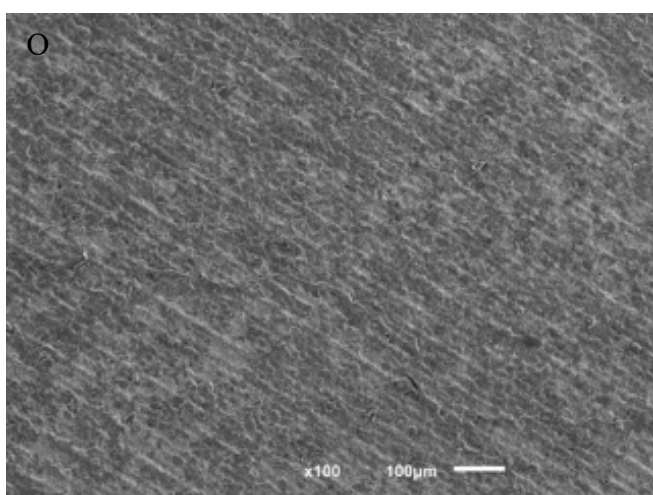
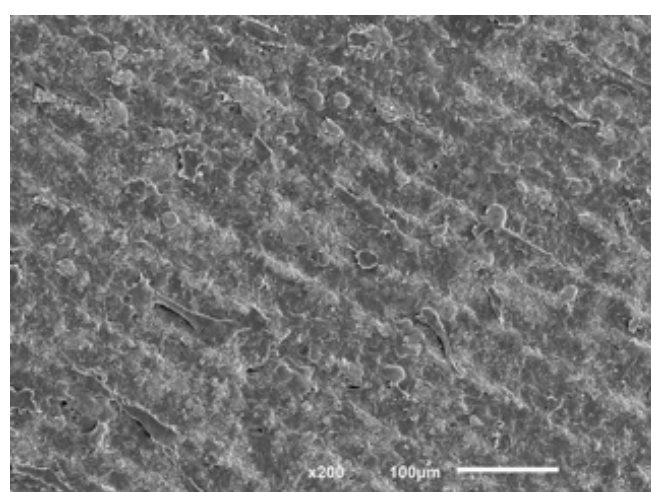
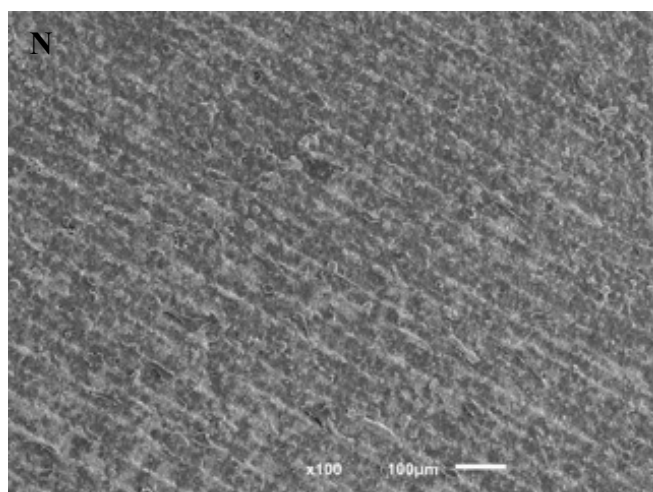
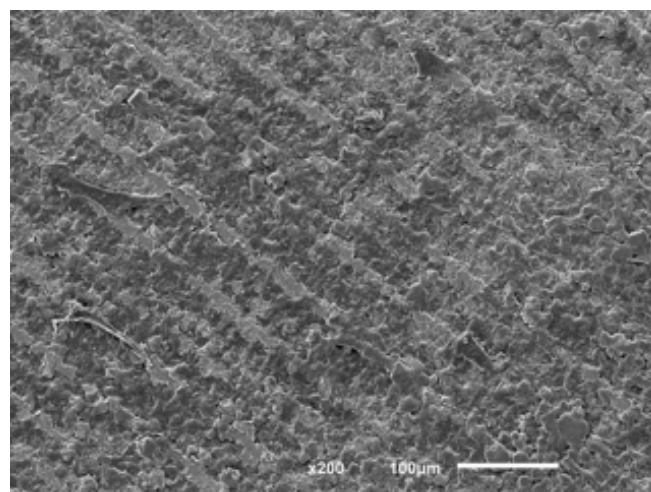
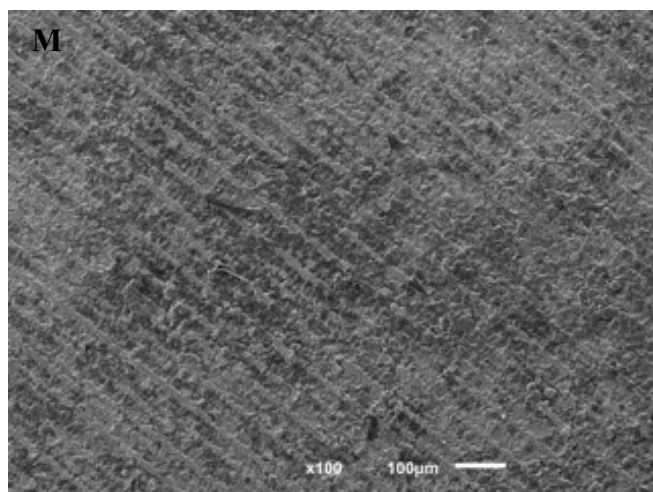




Imagem inicial

hFOB 24h

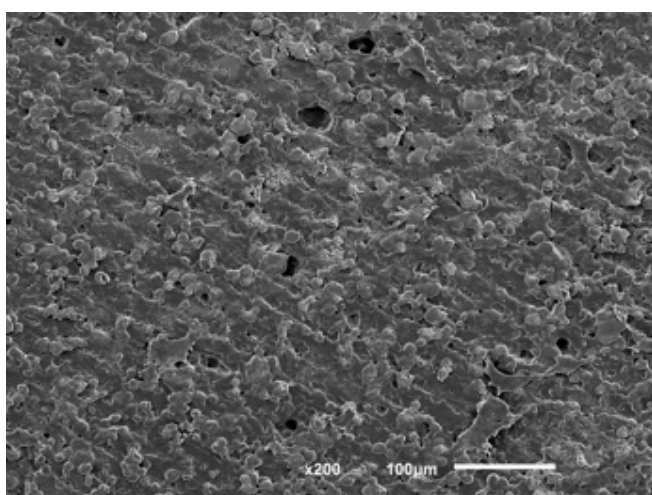
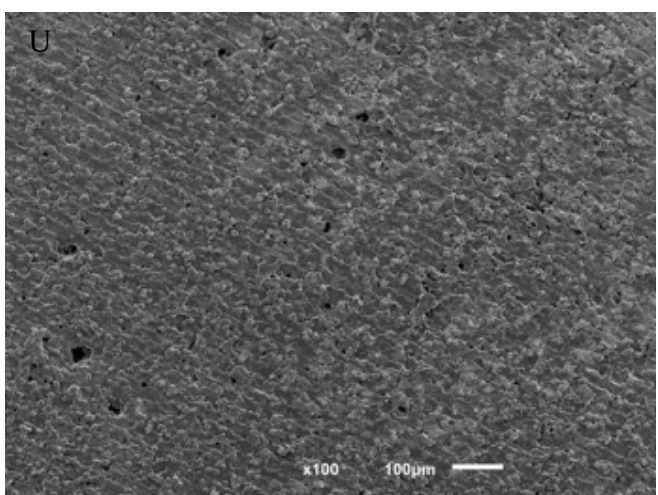
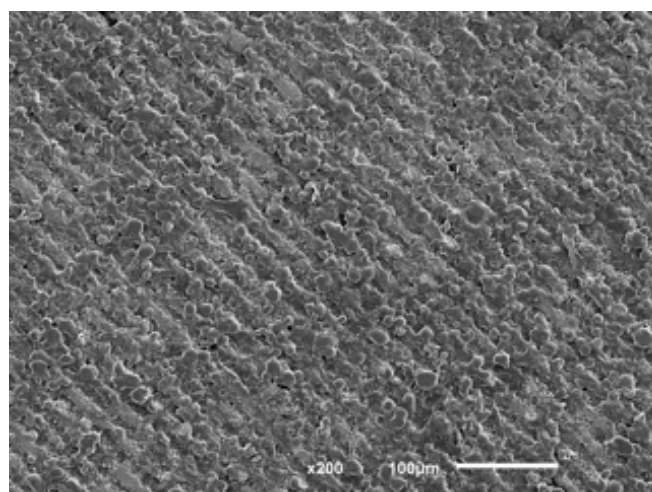
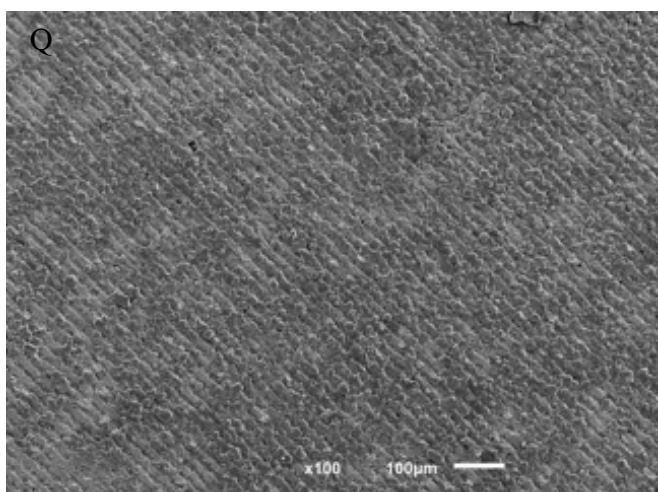
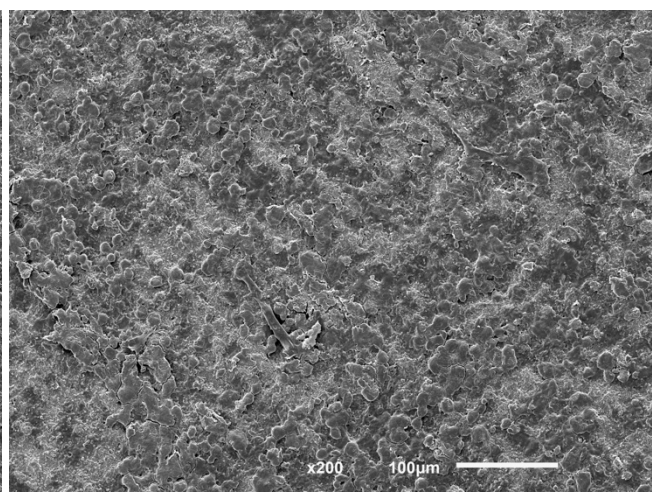
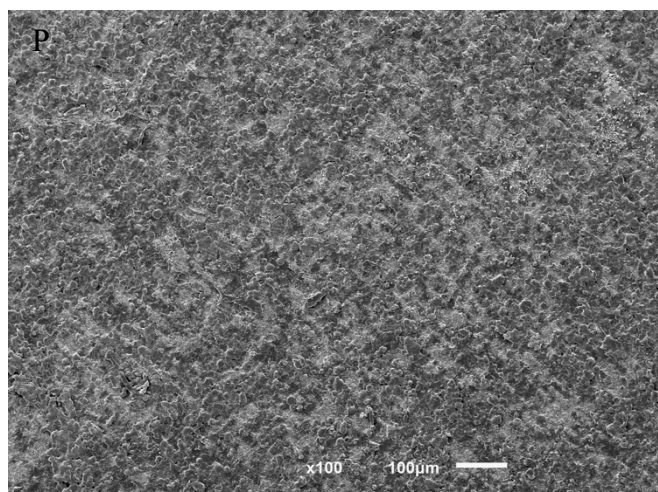
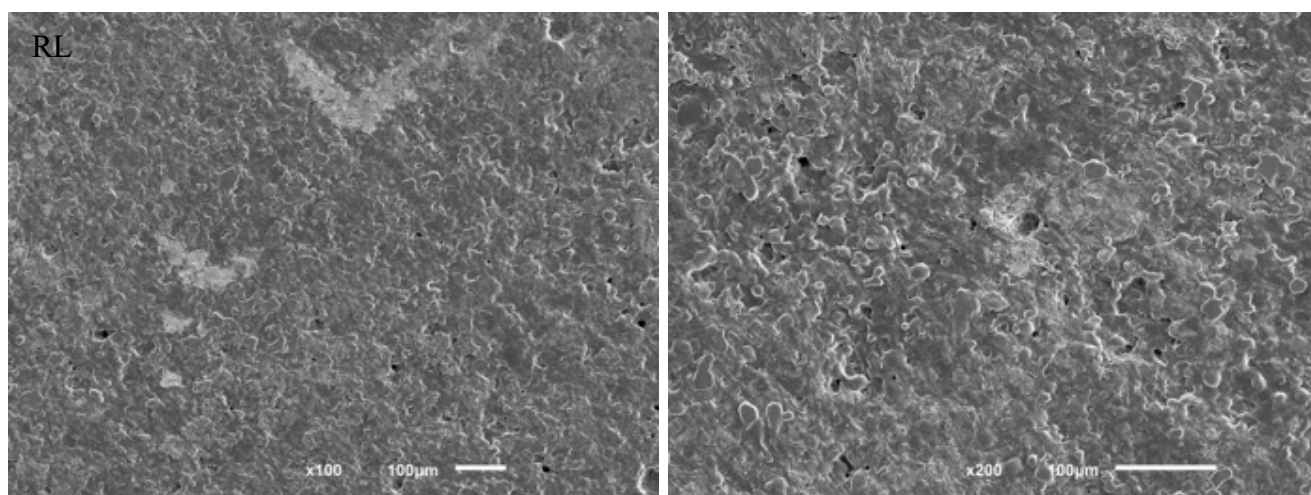


Imagem inicial

hFOB 24h



*Figura 2 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (FEG-SEM) após o primeiro dia de cultura das superfícies dos grupos A, B, C, D, E, I, M, N, O, P, Q, U e RL. Ampliações 100x e 200x.*